N°d'enregistrement
au C.N.R.S.:AO 11658

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PARIS VI

PAR

M. MARRAKECHI MOHAMED

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

SUJET DE LA THESE: CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYNTHESE DES ARN RIBOSOMAUX CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER

SOUTENUE LE: 19 SEP 1975

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Mme GANS M. Président
Mlle PRUD'HOMME N. Examinateurs
MM. MOUNOLOU J.C.
ROSSET R.
FUKUHARA H.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548908_0002

N°d'enregistrement
au C.N.R.S.:AO 11658

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PARIS VI

PAR

M. MARRAKECHI MOHAMED

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

SUJET DE LA THESE: CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYNTHESE DES ARN RIBOSOMAUX CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER

SOUTENUE LE:

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Mme GANS M. Président
Mlle PRUD'HOMME N. Examinateurs
MM. MOUNOLOU J.C.
ROSSET R.
FUKUHARA H.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT - PROPOS

Ce travail a été effectué au Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S. à Gif sur Yvette, sous la Direction de Melle N. PRUD'HOMME, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

J'exprime ma gratitude à M. Georges VALDEYRON, de l' Institut National Agronomique de Paris, à Mme M. GANS , MM. P. SLONIMSKI et P. VIGIER de l'Université Paris VI, dont les enseignements en 2ème cycle m'ont communiqué le désir de persévérer en Génétique.

Melle N. PRUD'HOMME m'a ensuite accueilli dans son laboratoire et c'est sous son initiative qu'a été entrepris ce travail ; sa patience, ses conseils fructueux, ses encouragements et surtout la confiance qu'elle m'a toujours accordée ont largement facilité la réalisation de ce travail. Qu'elle veuille bien trouver l'expression de ma reconnaissance la plus grande et de mes vifs remerciements.

Je suis très heureux d'exprimer ma gratitude à Mme M. GANS pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail et pour les conseils qu'elle n'a cessés de me prodiguer. Je lui dois beaucoup de ma formation scientifique. Avec Melle N. PRUD'HOMME, elle a su créer une ambiance extraordinaire d'entente, de coopération et de communication entre les divers membres de l'équipe. Je la remercie pour cela et également d'avoir bien voulu juger ce travail.

M. H. FUKUHARA, toujours enthousiaste et bien accueillant m'a constamment aidé et conseillé dans la réalisation des expériences biochimiques. Je le remercie pour cela et pour l'honneur qu'il me fait de juger mon travail.

A Messieurs J.C. MOUNOLOU et R. ROSSET, je désire exprimer toute ma gratitude pour l'honneur qu'ils me font d'examiner ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens à exprimer ici tout le plaisir que j'ai eu à faire équipe avec D. LOCKER. Notre collaboration amicale et efficace a été pour beaucoup dans la réalisation de ce travail.

Mme G. AUBERT, a bien voulu lire ce manuscrit. Qu'elle trouve ici l'expression de mes vifs remerciements pour ses suggestions et ses critiques fructueuses.

Mes remerciements vont également à Mme Y. ITURBIDE pour l'aide technique qu'elle m'a toujours assurée avec compétence, à Mme M.O. MOSSE pour l'analyse des échantillons à l'ultracentrifugeuse analytique et à Mme I. ERK et Mme A. GALLIOU qui m'ont prêté main forte à de nombreuses reprises.

Mme B. DUCHAUSSOIS a assuré avec dévouement la réalisation matérielle de ce travail, je l'en remercie très sincèrement.

Je désire remercier bien vivement S. CHEVAIS pour sa patience dans la réalisation des schémas illustrant ce travail.

Que tous mes camarades de laboratoire, en particulier ceux des groupes B2-B4 qui m'ont aidé à tous moments et auprès desquels j'ai trouvé l'amitié et la compréhension dans toutes les circonstances, soient assurés de toute ma reconnaissance. Quelle chance d'être un membre de cette famille scientifique et je souhaite vivement que notre collaboration puisse continuer dans l'avenir.

Ma femme a accepté beaucoup de sacrifices, qu'elle trouve également l'expression de ma reconnaissance.

Enfin, il m'est agréable de remercier M. H. ZEGHONDA (ex.Directeur de la Faculté d'Agronomie de Tunis) et M. N. CHALBI (Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis) pour les encouragements et l'aide qu'ils m'ont prodigués pour que ce travail arrive à terme.

S O M M A I R E

Pages

INTRODUCTION 1

MATERIEL ET METHODES 6

Abbreviations 6

I - Matériel et techniques biologiques 7

1) Souches de drosophiles 7

2) Elevage des drosophiles 7

3) Techniques utilisées pour faire pondre les mouches 7

4) Détermination du poids des individus 8

5) Détermination des stades de léthalité 8

II - Dosage des acides nucléiques au cours du développement 9

1) Extraction des acides nucléiques 9

2) Dosage des acides nucléiques 10

a) Estimation des acides ribonucléiques 10

b) Estimation de l'acide desoxyribonucléique 11

III - Marquage des acides nucléiques pour l'hybridation ADN-ARN 11

1) Marquage des ARN 11

a) Sur des larves 11

b) Sur des cultures de cellules 13

2) Marquage de l'ADN *in vitro* 13

IV - Extraction des ARN 14

1) Réactifs utilisés 14

2) Processus d'extraction 15

3) Dosage de l'ARN 16

V - Fractionnement de l'ARN 17

A - Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr 17

B - Centrifugation en gradient de saccharose 18

C - Electrophorèse en gel de polyacrylamide 19

VI - Extraction de l'ADN 22

A - Extraction de l'ADN à partir d'organismes entiers, des ovaires et des carcasses 22

B - Extraction de l'ADN à partir des glandes salivaires et des disques imaginaux 25

VII - Dosage de l'ADN 25

VIII - Hybridation moléculaire ADN-ARN 26

IX - Marquage des ARN et des protéines pour l'étude de leur synthèse 29

1) Marquage des organes in vitro 29

2) Marquage des organes in vivo 29

X - Détermination de la radioactivité spécifique des protéines 29

XI - Extraction et étude du profil ribosomal 31

a) Extraction des polysomes et ribosomes 31

b) Analyse sur gradient de densité de saccharose 31

XII - Traduction in vitro 31

a) Isolement des ribosomes et des fractions enzymatiques 31

b) Mélange réactionnel 32

PARTIE I

Détermination quantitative des acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques à différents stades du développement : Comparaison entre un mutant bobbed partiellement déficient en ADNr et la souche sauvage (bb^+) 34

A - INTRODUCTION 34

B - CROISEMENTS UTILISES ET INDIVIDUS ETUDIES 34

1) Souches de drosophiles 34

2) Individus étudiés 35

C - RESULTATS 37

1) Relation entre le poids individuel et le temps de développement dans les deux souches 37

2) Variation des quantités d'ADN au cours du développement 39

3) Variation de la quantité d'ARN en fonction de l'âge 42

4) Variation du rapport ARN/ADN en fonction de l'âge 45

D - DISCUSSION 45

PARTIE II

Etude des mutants bobbed induits à l'éthyl méthane sulfonate : nouvelle classe de mutants bobbed non déficients en ADN hybridable à l'ARNr. 50

CHAPITRE PREMIER : SELECTION DES MUTANTS BOBBED 50

A - INTRODUCTION 50

B - PROTOCOLE EXPERIMENTAL 51

1) Choix des souches à traiter 51

2) Choix de l'agent mutagène 52

3) Choix du système de sélection 53

4) Mutagénèse 53

5) Mise en évidence des mutations au locus bobbed 56

C - RESULTATS DE LA MUTAGENESE 57

D - ANNEXE 63

1) Nomenclature utilisée 63

2) Construction des souches 63

CHAPITRE II : CARACTERISTIQUES GENETIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES MUTANTS BOBBED SELECTIONNES 65

1) Localisation génétique 65

2) Effet de dosage 66

3) Détermination des stades de léthalité 70

4) Essai de réversion 74

a) Réversion par l'EMS 75

b) Réversion par magnification 75

CHAPITRE III : DETERMINATION DU NOMBRE DE GENES CODANT POUR LES ARNr 28S et 18S CHEZ LES MUTANTS BOBBED SELECTIONNES 79

1) Matériel biologique et techniques utilisés 79

a) Sources d'ADN 79

b) Purification de l'ADN 80

c) Source d'ARN ribosomal 80

d) Purification de l'ARN ribosomal 80

2) Résultats 80

3) Discussion 83

CHAPITRE IV : ETUDE D'UN MUTANT BOBBED AYANT UNE QUANTITE NORMALE D'ADN RIBOSOMAL : LE MUTANT bb^{P2} 87

1) Introduction 87

2) Hybridation moléculaire ADN-ARNr 88

3) Etude de la synthèse des ARN ribosomaux dans les ovaires incubés *in vitro* 92

4) Etude de la synthèse des ARN *in vivo* 100

a) Etude quantitative globale 100

b) Etude de la maturation des précurseurs des ARN ribosomaux 105

c) Expériences faites en isolant les ARN ribosomaux sur gel de polyacrylamide 105

CHAPITRE V : SYNTHESE PROTEIQUE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES RIBOSOMES EN PARTICULIER DE LEUR CAPACITE DE TRADUCTION DANS UN SYSTEME ACELLULAIRE 114

a) Effets de la mutation bb^{P2} sur la synthèse des protéines globales 114

α) Incorporation de la leucine ^{14}C et de l'uridine-5-^{3}H *in vitro* 115

β) Incorporation de la leucine ^{14}C et de l'uridine-5-^{3}H *in vivo* 115

γ) Mise en évidence d'un déficit de synthèse protéique dans la souche bb^{P2} 118

b) Répartition des polysomes et monosomes sur gradient de saccharose (10 %-40 %) 118

α) Analyse des polysomes et monosomes extraits de mouches âgées de 16 jours marquées soit à l'uridine-5-^{3}H soit à l'uridine ^{14}C 120

β) Analyse des polysomes et monosomes de mouches âgées de 16 jours et marquées simultanément à l'uridine-5-^{3}H et à la leucine ^{14}C 120

c) Traduction des ribosomes dans un système acellulaire 125

DISCUSSION 127

PARTIE III

Etude des gènes codant pour les ARN ribosomaux dans des tissus spécifiques de la larve et dans l'adulte entier des mâles sauvages (bb^{+}) et mutants bobbed. 133

A - Détermination des niveaux d'ADNr dans les tissus polytènes et diploïdes de la larve, ainsi que chez l'adulte entier 135

1) Génotypes des mâles 135

2) Techniques utilisées 136

3) Résultats 136

a) ADNr dans les tissus diploïdes 138

α) Témoins 138

β) Chromosome X correspondant à $In(1)w^{m4}bb$ 139

γ) Chromosome X portant bb^{P5} 139

b) ADNr dans les tissus polytènes 140

c) ADNr dans les mouches adultes 141

B - Etude de la synthèse des ARNr dans les glandes salivaires de la larve, dans les testicules et dans l'adulte entier 141

1) Mouches étudiées 142

2) Résultats 142

a) Synthèse des ARNr in vitro 142

α) Synthèse des ARNr dans les glandes salivaires 142

β) Synthèse des ARNr dans les testicules 145

b) Synthèse des ARN in vivo 148

C - Discussion

a) variation des quantités d'ADNr 153

b) Transcription de l'ADNr 157

CONCLUSIONS GENERALES ET RESUME 162

BIBLIOGRAPHIE 168

INTRODUCTION

Le premier mutant bobbed décrit chez *Drosophila melanogaster* a été découvert en 1925 par MORGAN, BRIDGES et STURTEVANT. Le phénotype bobbed se caractérisait par la réduction de la taille des soies, un développement larvaire retardé, une viabilité réduite et un abdomen plus ou moins déformé. Cette mutation liée au chromosome X présentait une expression limitée par le sexe. En 1927, STERN montrait l'existence d'un locus équivalent porté par le chromosome Y et depuis plusieurs mutations bobbed ont été sélectionnées aussi bien sur le chromosome X que sur le chromosome Y (MORGAN et coll. 1927 ; STERN 1929).

1) Localisation chromosomique.

La mutation bobbed a été localisée par STURTEVANT sur le chromosome X en position 66 (BRIDGES et BREHEME 1944). En étudiant une série d'inversions, COOPER (1958) a placé le locus bobbed près de l'organisateur nucléolaire. En ce qui concerne le chromosome Y, COOPER (1959) a montré que le locus bobbed se trouvait sur le bras court, à proximité des facteurs de fertilité ; cette localisation également coïncide avec la région organisatrice du nucléole.

Le nom d'organisateur nucléolaire a été donné par Mc CLINTOCK aux Constrictions secondaires des chromosomes. Travaillant sur le maïs, Mc CLINTOCK (1934) a montré qu'une délétion de cette région entraîne l'absence du nucléole correspondant. La même observation a été faite sur *Xenopus laevis* (ESPER et coll. 1964) ; chez cet amphibien, on a découvert un mutant sans organisateur nucléolaire cytologiquement visible. A l'état homozygote, la mutation entraîne la létalité au stade têtard ; l'hétérozygote est viable, mais présente un seul nucléole alors que le sauvage en possède deux.

2) Rôle du locus bobbed.

L'hypothèse selon laquelle le locus bobbed est responsable de la synthèse des ARN ribosomaux, tire son origine de plusieurs travaux qui

ont montré que le nucléole était impliqué dans la synthèse de ces ARNr (PERRY et coll. 1961 ; PERRY 1967). L'existence de mutants dépourvus de nucléoles chez *Xenopus laevis* ne synthétisant pas d'ARNr confirme clairement cette hypothèse (BROWN et GURDON 1964).

La mise au point de la technique d'hybridation moléculaire ADN/ARN (HALL et SPIEGELMAN 1962) a permis d'étudier la région organisatrice de nucléole chez différents organismes :

- Chez *Drosophila melanogaster*, RITOSSA et coll. (1965) ont montré que l'organisateur nucléolaire et l'ADN hybridable à l'ARNr que nous appellerons ADNr se trouvaient dans la même région. En effet ils ont observé que la quantité d'ADNr est directement proportionnelle au nombre d'organisateurs nucléolaires par cellule. Connaissant la quantité d'ADN par génome diploïde et le poids moléculaire des ARNr 28S et 18S, ils ont pu estimer, approximativement 260 à 300 gènes ribosomaux par génome diploïde. Les gènes ribosomaux sont donc répétés. En mesurant les quantités d'ADNr dans différentes souches bobbed, RITOSSA et coll. (1966a)ont montré que ces quantités d'ADNr variaient selon les souches mutantes étudiées. Les valeurs déterminées étaient toujours inférieures à celle trouvée dans la souche sauvage de référence.

- Chez *Xenopus laevis*, WALLACE et BIRNSTIEL (1966) ont également montré, que le mutant anucléolé ne possédait pas d'ADN hybridable à l'ARNr.

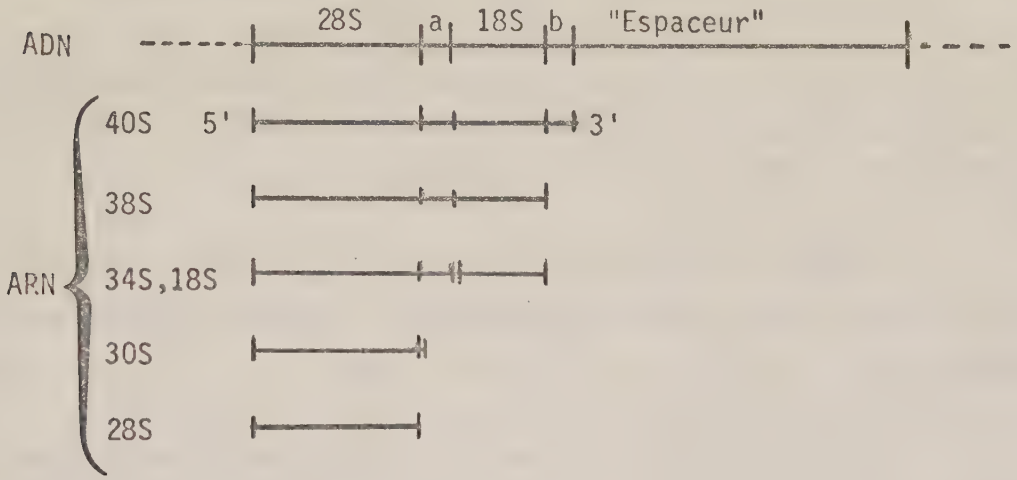
- Les mêmes techniques appliquées à d'autres organismes ont conduit à la même conclusion : la région organisatrice des nucléoles contient l'ADN responsable de la synthèse des ARNr 28S et 18S.

3) Organisation de l'ADNr

Chez plusieurs organismes supérieurs, en particulier chez *Xenopus laevis*, l'ADN codant pour les ARN ribosomaux 28S et 18S a une densité de flottaison élevée ; cette propriété a permis de le séparer du restant de l'ADN, par centrifugation en gradient de CsCl (BIRNSTIEL 1967). Cet ADN est répétitif ; il existe environ 450 séquences répétitives par organisateur nucléolaire. D'autre part, BIRNSTIEL et coll. (1968) ont montré que seulement 40 % de l'unité de répétition correspond aux séquences

codant pour les ARN 28S et 18S, 6 % aux séquences perdues lors de la maturation du précurseur et 54 % de séquences non transcrites ou "espaceur".

Les travaux de WENSINK et BROWN (1971), de WELLAUER et coll. (1974) concernant l'arrangement des régions 28S, 18S et de l'espaceur ont conduit ces auteurs à proposer le modèle suivant



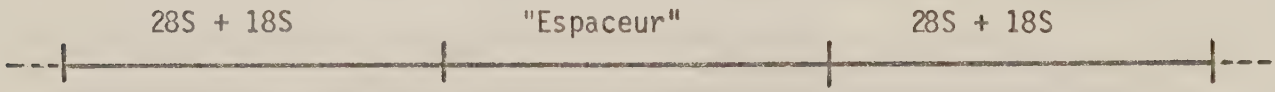
a,b : parties transcrites mais dégradées au cours de la maturation

Ce modèle présente simultanément l'organisation de l'unité de répétition de l'ADNr, et les différentes étapes de la maturation de l'unité de transcription qui est un précurseur commun (40S) aux ARNr 28S et 18S.

Chez *Drosophila melanogaster*, l'ADNr a une densité de flottaison en gradient de CsCl identique au reste de l'ADN et de ce fait, toutes les tentatives de purification n'ont pu aboutir. Cependant, l'existence des mutations bobbed partiellement déficientes en ADNr (QUAGLIORETTI et coll. 1968) et ayant perdu un même nombre de régions 28S et 18S est en faveur d'un modèle à séquences alternées. TARTOF et PERRY (1970) ont confirmé ce modèle en démontrant que chez la drosophile, comme chez les autres organismes supérieurs, le produit primaire de la transcription de l'ADNr est un précurseur commun - 38S - découpé ultérieurement en 28S et 18S.

HAMKALO et coll. (1973) ont observé les gènes ribosomaux au cours de fonctionnement, dans des embryons de *Drosophila melanogaster*. Les

images obtenues au microscope électronique leur ont permis de proposer la structure suivante :



4) Intérêt de l'étude du locus bobbed :

Nous venons de voir que le locus bobbed correspond à une répétition de séquences codant pour les ARNr 28S et 18S. Etudier cette région chez la drosophile présente plusieurs avantages :

- L'existence de nombreux mutants au locus bobbed, facilement reconnaissables (soies courtes, développement retardé et abdomen parfois déformé).

- L'instabilité génétique des mutants bobbed entraînant une variation du degré de redondance. La magnification et la minification (RITOSSA 1968a; LOCKER 1975).

- Le fait qu'il existe des tissus polytènes (glandes salivaires) avec des degrés de polyténie variable selon la zone du chromosome. (En particulier, il a été démontré que l'ADNr est moins répliqué que les zones euchromatiques (HENNIG et coll. 1971 ; SPEAR et coll. 1973).

- La possibilité de voir au niveau des chromosomes géants des remaniements génétiques et de réaliser des expériences d'hybridation cytologique.

- La possibilité, la drosophile étant bien connue génétiquement, d'étudier éventuellement la structure fine du locus bobbed. Signalons enfin que la drosophile est un organisme facile à élever et ayant un cycle de reproduction relativement court (environ 10 jours à 25°C).

Jusqu'à présent une bonne partie de ce que l'on sait sur les mécanismes de régulation tire son origine des études très nombreuses faites chez les procaryotes. Chez les eucaryotes, il est plus difficile

de trouver un organisme qui soit accessible génétiquement et biochimiquement. Comme nous venons de voir, il est possible d'obtenir des mutations au niveau du locus bobbed, et du fait de la redondance, il est également possible d'étudier qualitativement et quantitativement soit les séquences de l'ADN soit les ARNr transcrits sur ces séquences. Nous avons donc choisi ce système, pour étudier certains espects de la régulation du locus bobbed chez la drosophile.

Le travail présenté ici, comprend trois parties :

Dans une première partie, nous avons étudié à tous les stades du développement la croissance pondérale, et, les quantités d'acides nucléiques (ADN et ARN), chez un mutant bobbed déficient en ADNr et la souche sauvage bb^+. Cette étude nous a permis de mettre en évidence, qu'une synthèse accrue d'ARNr est nécessaire au cours des premiers stades larvaires.

Dans une deuxième partie, nous avons tenté de sélectionner à l'éthyl méthane sulfonate, des mutations de régulation au niveau du locus bobbed ; pour cela nous avons recherché des mutations ne correspondant pas à une déficience en ADNr. Parmi les mutations obtenues, l'une d'elles, subléthale à l'état homozygote a pu être étudiée en détail.

Enfin dans une troisième partie, nous avons étudié l'expression de l'ADNr chez des individus génotypiquement différents, soit par des expériences "in vitro" sur des glandes génitales et des glandes salivaires, soit par des expériences "in vivo". Parallèlement nous avons déterminé le nombre de gènes ribosomiques dans les tissus diploïdes (disques imaginaux et cerveaux) et les tissus polyténiques (glandes salivaires) ainsi que dans l'adulte entier.

MATERIEL ET METHODES

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomal codant pour les ARN ribosomaux 28S et 18S
ARN	Acides ribonucléiques
ARNr	ARN ribosomaux
ATP	Adénosine triphosphate
Ci	Curie
Cpm	Coups par minute
CTP	Cytosine triphosphate
D.T.T.	Dithiotréitol
E.D.T.A.	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
EMS	Ethyl méthane sulfonate
g	Accélération de la pesanteur
gr	Gramme
G.T.P.	Guanosine triphosphate
M	Mole
mCi	Millicurie
mgr	Milligramme
mM	Millimole
PEP	Phosphoénol pyruvate
P.T.C.	Phényl thiocarbamate
P.V.S.	Polyvinyl sulfate
P/V	Poids sur volume
S.D.S.	Sodium dodécyl sulfate
TCA	Acide trichlore acétique
µgr	Micro-gramme
µCi	Micro-curie
v/v	Volume/volume

I - MATERIEL ET TECHNIQUES BIOLOGIQUES :

1° - Souches de Drosophiles :

Pour plus de commodité, chaque chapitre décrit le matériel biologique utilisé.

2° - Elevage des Drosophiles :

Les mouches sont élevées sur un milieu standard composé essentiellement de levure de bière sèche et de farine de maïs, à la température de 23°C. A un litre d'eau nous ajoutons :

- Farine de maïs : 83 grs,
- Levure de bière : 83 grs,
- Agar : 14 grs et 50 ml de Moldex (méthyl hydroxy 4 benzoate dans l'alcool éthylique dans les proportions de 1 gr pour 10 ml d'éthanol) utilisé comme antifongique.

3° - Techniques utilisées pour faire pondre les mouches :

Cette technique a été mise au point et couramment utilisée dans le laboratoire de Monsieur ZALOKAR M. Elle permet d'accélerer le rythme de ponte et d'avoir des oeufs relativement synchrones. En manipulant les mouches avec précaution on arrive à avoir un développement synchrone de ± 15' (Bardes, M.F. 1971).

- Milieu de Ponte : Il est composé d'agar, de vinaigre, de levure fraîche et de saccharose. On prépare séparément un milieu A contenant 6 % d'agar dissous dans l'eau et un volume égal d'un milieu B composé de 900 ml de vinaigre à 6 %, 300 grammes de levure fraîche et 10 grammes de saccharose (Prolabo). Les milieux A et B sont stérilisés 20 minutes à 120°C et mélangés à chaud, avant la répartition dans les plaques de ponte; on ajoute une petite quantité de rouge neutre au mélange afin de mieux distinguer les oeufs.

- Pondoir (voir photo) : C'est un tube en verre d'environ 20 cm de long et 6 cm de diamètre. Il est ouvert d'un côté pour permettre l'introduction des mouches ; de l'autre côté, il est muni d'un fond plat possédant une fente à travers laquelle sont introduites les plaques de milieu. Dans chaque pondoir on met environ 300 à 400 mouches, mâles et femelles. On laisse les mouches pondre quelques heures sans changer de plaque de ponte jusqu'à ce qu'elles retrouvent leur rythme de ponte normal.

4° - Détermination du poids des individus :

Les pesées sont effectuées sur des groupes d'individus, et les poids notés représentent de ce fait des moyennes. Nous avons utilisé une balance Mettler qui pour des pesées inférieures à 10 mgrs donne une précision de $\frac{1}{100}$ ème près.

5° - Détermination des stades de létalité chez les mutants bobbed :

Cette étude a nécessité la mise au point, d'un système permettant de suivre l'évolution des larves depuis l'éclosion jusqu'à la pupaison.

Des croisements individuels ont été réalisés. Dans la descendance, les mutations bobbed seront soit à l'état homozygote bb^{Px}/bb^{Px} (♀) soit à l'état hétérozygote bb^{Px}/bb^{Py}. Les couples sont d'abord laissés trois jours sur un milieu standard frais, de façon à vérifier la fécondité du croisement ; puis transférés sur le milieu de ponte.

Le milieu de ponte est coulé sur une boîte de Pétri (9 cm de diamètre). Chaque couple est introduit dans un tube de verre ou de plastique (2 cm de diamètre sur environ 8 cm de long) dont une extrémité est enfoncée dans le milieu, et l'autre bouchée par du coton cardé. On peut disposer 4 à 5 tubes par boîte de Pétri.

Les oeufs pondus sont ramassés à intervalles de temps réguliers et transférés sur un milieu composé de 2% d'agar et 0,9% de chlorure de sodium (milieu isotonique). Une couche de levure fraîche est étalée à la surface du milieu pour servir de nourriture aux larves. Les boîtes de milieu contenant les oeufs sont mises à 23°C sous une atmosphère humide. Ce milieu transparent, permet de suivre commodement les oeufs et les larves. En outre, il est facile d'observer les oeufs sous la loupe ou même au microscope.

II - DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT

Les techniques utilisées sont celles décrites par CHURCH et ROBERTSON (1966) ; elles permettent des dosages sur des quantités très faibles de matériel biologique, allant de 50 larves du premier stade, à 5 pupes ou 3 adultes. Toutes les estimations d'ARN ou d'ADN ont été faites sur un minimum de 80 larves du 1er stade, de 30 pupes et de 30 adultes ; elles sont faites en double.

1° - Extraction des acides mucléïques :

Le broyage du matériel biologique s'effectue à froid dans de l'éthanol à 95° en utilisant de petits broyeurs en verre (1 ml d'éthanol pour 10 mgrs de tissu frais). L'homogénat est centrifugé légèrement à très faible vitesse pour éliminer les Cuticules et autres débris.

- Elimination des lipides : Le surnageant est réhomogénéïsé puis centrifugé à 2000 g pendant 5 minutes. On élimine le surnageant alcoolique puis on traite le culot au méthanol chloroforme (2/1, v/v) à 4°C pendant 15 minutes. Après centrifugation (10 minutes à 2000 g) on répète le traitement au méthanol chloroforme deux à trois fois afin d'avoir un surnageant bien clair. Ces différentes opérations permettent d'éliminer les lipides.

- Elimination de l'acido-soluble : Le culot est suspendu dans 1 ml d'acide perchlorique glacé 0,3 N. Après 15 minutes à 0°C, on centrifuge pendant 10 minutes à 2000 g et on élimine le surnageant qui contient la fraction acido-soluble, puis le traitement du culot est répété une seconde fois ; finalement on lave le culot avec de l'eau glacée.

Lorsqu'il s'agit de larves du 3ème stade ou de pupes, avant la deuxième centrifugation, on dialyse la suspension (culot plus acide perchlorique) contre une solution de triéthanol-amine 0,01 M (pH = 7) pendant 2 heures à 45°C. Ce traitement a pour but d'éliminer l'acide urique, qui à ces stades existe en quantités importantes (BERNARD et FIXLER 1963) ; or l'acide urique, comme le ribose, donne une réaction colorée avec l'orcinol.

- Séparation des acides nucléiques : D'après la méthode de SHMIDT et THANNHAUSER (1945) modifiée par FLECK et MUNRO (1962).

- Fraction d'acides ribonucléiques : Elle est obtenue en soumettant le résidu final à une hydrolyse basique : on lui ajoute 1 ml de potasse 0,3 N puis on laisse agir pendant 2 heures à 37°C. Après l'hydrolyse on ramène à pH = 2 par addition d'acide perchlorique concentré glacé (environ le trentième du volume de l'hydrolysat). L'ADN, les protéines et le perchlorate de potassium (clo4k) précipitent. Après centrifugation (10 minutes à 2000 g), le précipité est récupéré, lavé avec 0,5 ml de perchlorate de potassium 0,1 N, puis centrifugé de nouveau comme précédemment. Les surnageants rassemblés dans un même tube constituent la fraction des acides ribonucléiques.

- Fraction des acides désoxyribonucléiques : Le précipité mentionné ci-dessus est soumis à une hydrolyse perchlorique à chaud : mise en suspension dans 1 ml d'acide perchlorique 1 N, chauffage pendant 15 minutes au bain-marie à 80°C puis centrifugation ; on renouvelle l'hydrolyse en suspendant cette fois dans 0,5 ml d'acide perchlorique, le culot final est lavé à l'acide perchlorique 1 N. Les surnageant rassemblés, constituent la fraction ADN.

2° - Dosage des acides nucléiques :

a) Estimation des acides ribonucléiques : Nous avons utilisé la méthode à l'orcinol décrite par SCHNEIDER (1957). Une aliquote de la fraction ARN ramenée à 1,5 ml, est chauffée avec 1,5 ml de réactif orcinol pendant 20 minutes à 100°C. On dose les ARN en mesurant l'absorption à 660 nm et en se référant à une gamme standard établie avec de l'ARN de levure.

Le réactif orcinol est obtenu en dissolvant 1 gr d'orcinol pur dans 100 ml d'acide chlorhydrique concentré contenant 0,5 gr de chlorure ferrique (Fe Cl 3)

b) Estimation de l'acide désoxyribonucléique :

La méthode classique de DISHE (1930) modifiée par BURTON (1956), et rendue plus sensible par GILES et MYERS (1965), a été utilisée. Le réactif est obtenu en dissolvant 400 mgrs de diphénylamine dans 10 ml d'acide acétique glacial.

Le dosage se fait en ajoutant à 2 ml de la solution d'ADN dans l'acide perchlorique 1 N, 2 ml de réactif diphénylamine et 0,1 ml d'une solution d'acétaldéhyde à 0,16%. Les tubes de dosage sont placés, pendant 15 à 18 heures à 30°C. La différence d'absorption entre 595 et 700 nm permet de déterminer la valeur en ADN de chaque tube en se référant à une gamme faite en même temps avec l'ADN de thymus de veau.

Les quantités d'ADN dans l'oeuf et les jeunes larves sont très faibles (LESLIE 1955, LEVENBOOK et COLL. 1958, CHURCH et ROBERTSON 1966). A ces stades on est limité par la quantité de matériel biologique disponible. Comme CHURCH et ROBERTSON (1966) nous avons enrichi en ADN chaque fraction à doser, en ajoutant un volume connu d'une solution d'ADN de référence, dissous dans l'acide perchlorique.

III - MARQUAGE DES ACIDES NUCLEIQUES POUR L'HYBRIDATION ADN-ARN :

1° - Marquage des ARN :

a) Sur des larves :

Techniques de marquage : Les ARN marqués par cette méthode ont été obtenus exclusivement à partir des larves sauvages de la souche Oregon R de Paris. Le milieu de croissance (RITOSSA et COLL 1965) est fait en ajoutant à 10 ml d'eau : 0,8 gr de farine de maïs, 0,6 gr de saccharose, 0,1 gr d'agar, 27 mgrs de méthyl-p-hydroxybenzoate, environ 0,5 gr de levure fraîche et 7 mCi d'uridine tritiée (Uridine-5-^{3}H) ayant une activité spécifique de 21 Ci/mM (C.E.A. Saclay). 10 ml de ce milieu appauvri en levure permettent le développement de 2 à 3 grs de larves.

Dans certaines expériences de marquage, la levure fraîche froide a été remplacée par de la levure marquée à l'Uracile tritiée (5-^{3}H). La souche de levure utilisée est exigeante en Uracile. Elle a été préalablement cultivée sur un milieu synthétique contenant 10 mCi d'Uracile tritiée par litre de milieu. En plus de la levure marquée, 4 mCi d'Uridine tritiée ont été ajoutées au milieu de croissance (cette technique de marquage a été ultérieurement étudiée plus profondément par MAZABRAUD A. (1973). Cette seconde méthode a été utilisée dans nos premières expériences de marquage. En effet, en utilisant le technique de marquage décrite par RITOSSA et COLL. (1965), nous obtenions une radioactivité spécifique de l'ARN purifié qui n'excédait guère 10 000 c.p.m. par µgr d'ARNr, marquage faible pour réaliser des expériences d'hybridation ADN-ARNr. Il est apparu que la raison essentielle de ce faible marquage était l'ancienneté des solutions d'Uridine tritiée utilisées ; un phénomène de radiolyse s'était donc produit.

A condition d'utiliser des solutions d'Uridine-5-^{3}H dès leur réception ou au plus tard un mois après, la technique décrite par RITOSSA permet d'obtenir un très bon marquage ; et nous l'avons donc réutilisée pour nos expériences ultérieures. JORDAN (communication personnelle) a remarqué le même phénomène sur des cultures de cellules de Drosophile.

Récolte des larves marquées : On laisse les larves évoluer sur le milieu radioactif pendant 5 à 7 jours. Dès l'apparition des premières pupes, on ramasse les larves en ajoutant dans le tube de culture une solution de saccharose ou de glycerol à 50%. Les larves, moins denses que la solution, flottent. On les transvase dans un tube de centrifugation et on les centrifuge pendant 2 minutes à 1000 tours/minute dans l'International PR 2. Les larves restent en haut du tube alors que les débris de milieu tombent au fond. On les passe par la suite sur un filtre de verre et on les lave plusieurs fois à l'eau distillée. Enfin elles sont ramassées avec une spatule et peuvent être conservées à - 70° jusqu'à leur utilisation. Mais généralement l'extraction de l'ARN est faite immédiatement après la récolte des larves.

b) Sur des cultures de cellules de Drosophile : Des ARN ribosomaux 28 S et 18 S ayant une forte activité spécifique, nécessaires pour les expériences d'hybridation moléculaire utilisant des faibles quantités d'ADN extraites soit des glandes salivaires soit des cerveaux et disques imaginaux, sont obtenus à partir des cellules de Drosophile maintenues en culture. Nous avons utilisé la lignée cellulaire KC établie depuis quelques années par le Professeur G. ECHALIER et A.OHANESSION (1969-1971) à partir d'embryons de *Drosophila melanogaster*.

Toutes les cultures ont été faites par le Professeur G. ECHALIER en utilisant le milieu de culture standard (G. ECHALIER et COLL. 1970) supplementé ou non avec du sérum de veau fœtal et contenant 50 à 90 µCi/ml d'Uridine tritiée (20 Ci/mM).

Au moyen d'une préculture, on ensemence environ une quinzaine de boîtes de falcon contenant 12 ml de milieu tritié par boîte. Après 5 jours d'incubation à 25°C (confluence compléte de la culture), les cellules sont détachées de la boîte en les baignant pendant quelques minutes dans 10 ml de milieu de culture additionné de trypsine 0,25% et d'EDTA, 2 mM. Cette opération est suivie d'un raclage à l'aide d'une pipette Pasteur courbée afin de détacher les nombreuses cellules ayant resisté à l'action de la trypsine. Les cellules sont concentrées par centrifugation à 2000-3000 tours par minute pendant 10 minutes à 0°C. Le culot cellulaire est suspendu dans le tampon d'extraction des ARN et conservé à - 70°C.

2° - Marquage de l'ADN "in vitro"

Les quantités d'ADN extraites des glandes salivaires et des cellules diploïdes (Disques imaginaux et Cerveau) sont très faibles. Il est donc impossible de contrôler la fixation de cet ADN sur des filtres de nitrocellulose en mesurant la densité optique à 260 nm avant et après filtration. Pour cette raison nous avons utilisé l'ADN marqué à la thymidine-^{14}C (20 à 30 µCi/ml).

Les glandes salivaires et les cerveaux sont extraits sous le binoculaire à partir des larves mâles de 3ème stade. Le milieu de dissection et d'incubation est un milieu minimum utilisé pour les cultures de cellules de Drosophile (ECHALIER et COLL.1970).

Les tissus sont incubés pendant les temps variables allant de 2 à 6 heures à la température de 23°C dans une goutte de ce milieu placée sous huile de paraffine (20 à 30 µCi de thymidine ^{14}C par ml de milieu). L'incubation est arrêtée par fixation des tissus dans l'éthanol (70%).

Ces conditions permettent d'obtenir un ADN ayant une radioactivité spécifique de 500 à 3000 c.p.m.

IV - EXTRACTION DES ARN :

Les acides ribonucléiques sont dans la cellule associés aux protéines ; en outre, ils sont en présence de ribonucléases cellulaires. Leur séparation des protéines et surtout leur sensibilité aux nucléases constituent les principales difficultés de préparation. Il est important d'utiliser des inhibiteurs des ribonucléases laissant intact la structure macromoléculaire de l'ARN.

Deux techniques sont couramment utilisées pour extraire les ARN des Drosophiles : celle décrite par RITOSSA et Col. (1965) et celle décrite par HASTINGS et KIRBY (1966). La première, beaucoup plus simple a été couramment utilisée dans ce travail pour extraire les ARN des larves, des mouches, ou même des organes (ovaires, testicules, glandes salivaires).

Pour extraire les ARN des cellules nous avons utilisé la technique décrite par SPEAR et GALL (1973).

1° - Réactifs utilisés :

a) Agents de déprotéïnisation :

- Phénol (MERCK) : Le phénol est redistillé avant d'être saturé par addition d'une solution de chlorure de sodium 0,1 M. Pour éviter l'oxydation de la solution phénolique on y ajoute de l'hydroxy-8-quinoleine (0,1% P/V)

- Sodium lauryl sulfate (MERCK) : SDS

Il permet de dissocier les protéines des acides nucléïques sans interagir avec ces derniers.

b) Inhibiteurs des nucléases :

A côté du SDS nous avons couramment utilisé l'héparine ou le polyvinylsulfate.

- Héparine : C'est une macromolécule polyanionique qui a plus d'affinité pour les protéines basiques que pour les protéines acides.

- Polyvinylsulfate (FELLING et Coll. 1959) : PVS

Le PVS est utilisé sous forme de sel de potassium (Eastman Kodak). Il s'agit d'un polyanion qui complexe les protéines basiques. Il a été utilisé à raison de 20 µgrs/ml.

c) Solutions d'extraction :

- Solution d'extraction des ARN à partir des l'organisme entier ou de certains organes (RITOSSA et Coll. 1965) : Na Cl = 0,1 M ; SDS : 1% ; Héparine : 0,001% ou PVS : 20 µgrs/ml,

- Solution d'extraction des ARN à partir des cellules (BROWN et Coll. 1964) : Tampon acide acétique-acétate de sodium pH 5,1 (20 mM), SDS : 1%, PVS : 20 µgrs/ml.

2° - Processus d'extraction :

a) A partir de l'organisme entier ou de certains organes :

Toutes les opération sont faites entre 0 et 4°C.

Le matériel biologique est suspendu dans les solutions d'extraction ; il est aussitôt homogénéisé dans un mortier avec cette solution à raison de 10 volumes par poids de matériel (on commence à homogénéiser dans une partie de la solution). On ajoute à l'homogénat un volume égal de phénol froid saturé d'une solution saline (Na Cl 0,1 M). Le mélange est agité mécaniquement pendant 20 minutes à 0°C. Il est ensuite centrifugé 20 minutes à 5000 g. La phase aqueuse supérieure est récupérée et extraite à nouveau deux fois au phénol (une fois 20 minutes et une fois 10 minutes).

Sur la phase aqueuse ainsi obtenue à la dernière centrifugation, les acides nucléiques sont précipités en ajoutant deux volumes d'éthanol absolu et froid (-20°C) contenant de l'acétate de sodium (0,02 M). Après avoir été agité, le mélange est laissé à -20°C pendant quelques heures (le temps de précipitation dépend de

la concentration en acides nucléïques). Le précipité est récupéré par centrifugation (30 minutes à 5000 g). Afin d'éliminer les traces de phénol, le précipité est séché sous vide, repris dans un petit volume d'une solution de Na Cl, 0,1 M et reprécipité de nouveau avec deux volumes d'éthanol. Le précipité d'acides nucléiques est conservé dans l'alcool à -20°C ou -70°C en attendant la phase de purification.

b) Extraction des ARN à partir des cultures cellulaires de Drosophile :

Les cellules marquées sont suspendues dans un tampon acétate 0,01 M, pH = 5,1, contenant 0,1 M Na Cl, 1% Sodium dodécyl sulfate et 20 µgrs/ml de polyvinyl sulfate. Le lysat est extrait toute la nuit à 4°C en y ajoutant un volume égal de phénol saturé avec le tampon acétate. Après une centrifugation à 7000 g pendant 15 minutes la phase aqueuse est séparée de la phase phénolique. On retraite de nouveau au phénol pendant 30 minutes, on recentrifuge et on sépare la phase aqueuse comme précédemment. On y ajoute deux volumes d'alcool très froid contenant 0,02 M d'acétate de sodium et on laisse les acides nucléiquesprécipiter pendant quelques heures à -20°C. Le précipité est enfin récupéré par centrifugation (5000 g pendant 30 minutes). Pour éliminer les traces de phénol on lave le précipitéune à deux fois à l'alcool absolu contenant 0,02 M d'acétate de sodium. Ce procédé permettant d'éliminerle phénol est très efficace ; il a été préféré à celui utilisé par SPEER et Coll. (1973) consistant à traiter à l'éther la phase aqueuse juste avant la première précipitation à l'alcool.

Le précipité d'acide nucléique est conservé dans l'alcool à -20°C ou -70°C.

3° - Dosage de l'ARN extrait :

Avant de soumettre l'ARN total aux différentes techniques de fractionnement, on mesure les densités optiques à 260, 280, et 230 nm de façon à apprécier le degré de pureté de la préparation et sa concentration en ARN. Pour cela, le précipité d'ARN est

débarrassé complètement de l'alcool et dissous dans le tampon d'homogénéïsation.

Les valeurs des rapports des densités optiques 260/280 et 260/230 permettent d'apprécier la pureté de la préparation. Des valeurs supérieures à 2 sont considérées comme suffisantes pour une solution assez pure. On admet qu'une unité de densité optique à 260 nm et pour un trajet optique de 1 cm correspond à 50 µgrs/ml d'ARN.

Une valeur du rapport 260/280 inférieure à 2 indique la présence d'ADN dans la préparation. La méthode utilisée pour extraire l'ARN de l'organisme entier extrait en même temps l'ADN.

V - FRACTIONNEMENT DE L'ARN :

Les techniques couramment utilisées pour fractionner l'ARN sont :
- Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée-Kiéselguhr,
- Centrifugation sur gradient de saccharose,
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

A - Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée-Kieselguhr :

L'albumine méthylée fixée sur la terre à diatomées (Kieselguhr) retient les acides nucleïques, lorsqu'elle est équilibrée à une faible concentration saline. L'élution par un gradient de chlorure de sodium (0,1 M-1,2 M) permet de séparer les divers ARN selon les critères suivants :

- Le poids moléculaire : les ARN de poids moléculaire faible sont élués les premiers ; ainsi, dans l'ordre on sépare tout d'abord les ARN de transfert (4s) l'ARN ribosomal 5s et les ARNr 18s et 28s
- La composition nucléotidique : les ADN riches en G + C sont séparés avant ceux riches en A + T (SUEOKA et CHENG 1962).
- Etat de la molécule ; les ADN et les ARN dénaturés thermiquement sont élués à une concentration en Na Cl plus élevée que les ADN ou ARN natifs (AUBERT et Coll. 1968).

Les colonnes sont préparées selon la technique de MENDELL et HERSHEY (1960). L'albumine méthylée préparée selon la méthode de HAYASHI et Coll. (1963) nous a été fournie par Monsieur FUKUHARA.H.

Le Kieselguhr utilisé comme support est de la "célite hyflosupercel" (Serlabo).

Pour fractionner 2 à 3 mgrs d'ARN on prépare une solution d'albumine méthylée dans 10 ml d'eau ; après solubilisation, on ajoute 25 ml de suspension de Kieselguhr dans l'eau (50% de volume humide dans le volume final). On laisse reposer le mélange 5 à 10 minutes à la température ambiante.

Sur une colonne de 2 cm de diamètre on dépose successivement une couche de coton hydrophile, une couche de poudre de cellulose (cellulose powder CF1) très mince et une couche de Kieselguhr (4 ml environ de la suspension de Kieselguhr dans l'eau) permettant de fixer l'albumine méthylée libre. Après stabilisation on verse la suspension d'albumine méthylée Kieselguhr puis une nouvelle couche protectrice de Kieselguhr. On lave enfin la colonne avec de l'eau et on l'équilibre avec un tampon phosphate 0,05 M, pH 6,8 (0,025 M phosphate monosodique (MERCK) et 0,025 M phosphate disodique -MERCK-) contenant 0,1 M Na Cl. La colonne est ainsi prête à absorber l'ARN en solution dans le même tampon phosphate contenant 0,2 M Na Cl.

L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de 200 ml de chlorure de sodium (0,1 M-1,2 M) dans le tampon 0,05 M phosphate. Au cours de l'élution la densité optique est mesurée en continu à 254 nm grâce à un spectrophotomètre Uvicord (LKB). Le fractionnement a lieu à la température ordinaire. La détermination de la concentration en Na Cl de chaque fraction, en mesurant l'indice de réfraction, permet de connaître la molarité d'élution correspondant à chaque pic de densité optique.

B - Centrifugation en gradient de saccharose (SHERRER et DARNELL 1962) :

La centrifugation a lieu à 4°C dans le rotor Spinco SW 25-1. Les gradients linéaires de 5% à 17% de saccharose ("Ribonucléase free" MERCK ou MANN) sont préparés comme suit :

On dissout le saccharose soit dans Na Cl 0,1 M soit dans le tampon acétate pH 5,1 contenant un inhibiteur des ribonucléases. L'appareil utilisé a été construit au laboratoire et comprend deux

cuves. Un robinet à deux positions met en relation les deux cuves. Dans une cuve on met la solution de saccharose la plus concentrée et dans l'autre, la moins concentrée. Le gradient se réalise au fur et à mesure de l'écoulement dans la cuve contenant la solution la plus concentrée, en mélangeant soit à l'aide d'air comprimé, soit à l'aide d'un agitateur magnétique.

Les échantillons d'ARN dissous dans un petit volume de tampon sont déposés délicatement à la surface des gradients, de 28 ml. La centrifugation est effectuée à 24 000 tours par minute pendant des temps variant avec les différentes expériences.

C - Electrophorèse en gel de polyacrylamide :

Les gels de polyacrylamide sont préparés selon la méthode décrite par LOENING (1967). Ils sont le produit de polymérisation de l'acrylamide avec un agent de pontage, la N, N' méthylène bisacrylamide. Le diamètre des pores dépend de la proportion en bisacrylamide. Les gels concentrés permettent de séparer les ARN de faible poids moléculaire, et, les gels dilués fractionnent les ARN de haut poids moléculaire (ARN ribosomaux).

a) Réactifs utilisés :

- Acrylamide et bisacrylamide sont purifiés par recristallisation : 70 grs d'acrylamide et 10 grs de bisacrylamide sont dissous à 50°C respectivement dans 1 litre de chloroforme et dans 1 litre d'acétone. Les deux solutions sont ensuite filtrées puis refroidies à -20°C.

- N N N'N' TEMED (FLUKA) et persulfate d'ammonium sont utilisés comme réactifs de polymérisation.

- Le tampon utilisé est un tampon tris-acétate concentré 3 fois et appelé 3E : 0,12 M Tris, 0,06 M acétate de sodium, 0,003 M EDTA tétrasodique, SDS 0,6%, ajusté à pH 7,2 avec l'acide acétique glacial. Le tampon d'électrophorèse E est obtenu en diluant 3 fois le tampon.

- Le tampon utilisé pour resuspendre l'ARN (MAZABRAUD 1973) : Acétate de sodium 0,02 M, Chlorure de magnésium 0,0001 M,

Chlorure de sodium 0,05 M, PVS 6 µgrs/ml, SDS 0,2%, est ajusté à pH 7,1.

b) Préparation des gels (voir tableau 1)

On commence tout d'abord par dégazer le mélange acrylamide bisacrylamide et tampon d'électrophorèse correspondant à une concentration donnée d'acrylamide. Les catalyseurs de polymérisation sont ensuite ajoutés (N N N'N' TEMED et persulfate d'ammonium à 10%). Après homogénéïsation la solution est pipetée dans les tubes d'électrophorèse (quartz ou plastique 12 cm x 0,6 cm). On dépose au dessus une mince couche d'eau et on laisse la polymérisation se faire à la température de la pièce pendant au moins une heure.

c) Electrophorèse :

Elle est réalisée à la température de la pièce à l'aide d'un générateur de courant stabilisé et de cuves supportant les tubes (BUCHLER ou PLEUGER). Les deux réservoirs renfermant le tampon d'électrophorèse communiquent entre eux par les gels. Une préélectrophorèse de 30 minutes à 5 mA par tube permet une élimination importante du persulfate. L'ARN dissous dans le tampon (50 µl environ) est alourdi en ajoutant du saccharose ("Ribonucléase free") ou du glycérol jusqu'à une concentration de 5%. L'échantillon est placé doucement à la surface du gel à l'aide de micropipette EPPENDORF. L'électrophorèse est faite pendant 2h 30' à 3 heures avec le même ampérage que pour la préélectrophorèse. Les acides nucleïques chargés négativement migrent vers l'anode.

d) Lecture des gels à 260 nm :

Elle est faite à l'aide d'un densitomètre "JOYCE LOEBL polyfrac" dont la réponse est linéaire de 0 à 3 unités de densité optique. Les gels faits dans des tubes de plastique sont tout d'abord démoulés (avec une seringue et de l'eau distillée) et placés dans une cuve en quartz à faces parallèles. La densité optique des gels faits dans des tubes en quartz est obtenue directement.

T A B L E A U - 1 -

Quantités en grammes d'acrylamide et bisacrylamide, et volumes de tampon d'électrophorèse E, à mélanger pour obtenir 100 ml de gel à une concentration donnée.

Concentration du gel en %	2,2	2,4	2,6	6,8
Acrylamide en grammes	2,2	2,4	2,6	6,8
Bisacrylamide en grammes	0,11	0,12	0,13	0,17
Tampon E en ml	100	100	100	100
TEMED 10% en ml	0,4	0,4	0,4	0,4
Persulfate d'ammonium : 10% en ml	0,4	0,4	0,4	0,4

Le persulfate d'ammonium (10%) est préparé extemporanément.

e) Découpage des gels :

Les gels démoulés sont congelés à la neige carbonique. Ils sont ensuite découpés en tranches à l'aide d'un appareil "Slicer Joyce Loebl". La mesure de la radioactivité est faite sur chaque tranche. Les tranches sont mises séparément dans des flacons de scintillation ; on ajoute 0,2 ml de soude 1 N ou 0,5 ml d'ammoniaque concentré et on laisse agiter une nuit à la température ordinaire. On peut aussi traiter le mélange à 80°C pendant une heure.

On ajoute ensuite le milieu scintillant BRAY (1960) :
4 grs P.P.O, (diphényl 2-5-oxazole), 200 mgrs PoPoP (p-phénylène bis méthyl 4 phényl 5 oxazole), 20 ml d'éthylène glycol, 100 ml de méthanol, 60 grs de Naphtalène et on complète à un litre avec du dioxane.

La radioactivité est mesurée dans un Scintillateur Inter-technique, type SL 30.

VI - EXTRACTION DE L'ADN :

Deux techniques ont été utilisées pour extraire l'ADN. La technique de MARMUR (1961) avec plusieurs modifications et la technique décrite par SPEAR et GALL (1973). Cette dernière a été utilisée pour extraire l'ADN des glandes salivaires et des disques imaginaux, donc à partir d'une faible quantité de matériel.

A - Extraction de l'ADN à partir d'organismes entiers, des ovaires ou des carcasses (mouches débarrassées de leurs ovaires) :

La tchnique utilisée est celle de MARMUM (1961) modifiée par RITOSSA et Coll. (1965). Dans le but d'améliorer le rendement, nous lui avons ajouté certaines modifications.

a) Réactifs utilisés :

Le tampon d'extraction comprend :

- Tris-Hcl 0,05 M pH = 8, Na Cl 0,15 M, EDTA 0,1 M et 2% de SDS.

- Chloroforme-isoamyl alcool (24/1 V/v) : déproteïnise les acides nucleïques ; en effet le chloroforme dénature les proteïnes et l'isoamyl alcool, aide à la sépartion de celles-ci.

- Perchlorate de sodium (Clo4Na) : à une forte concentration il permet la dissociation des proteïnes et des acides nucleïques.

- SSC (chlorure de sodium-Citrate trisodique) : c'est un tampon à pH 7,2. Utilisé à différentes concentrations pour stabiliser l'ADN en solution et chelater les ions Mg^{++} nécessaires à l'activation de certaines nucléases.(SSC = 0,15 M Na Cl - 0,015 M Citrate trisodique).

- α Amylase (pancréas-Sigma) : Utilisée pour la dégradation des polysaccharides.

- Ribonucléase A (Calbiochem) : Utilisée pour digérer les ARN. Avant utilisation elle est chauffée pendant 10 minutes à 100°C pour éliminer toute activité DN Asique due à une possible contamination par la desoxyribonucléase.

- Pronase (Calbiochem, Grade B) : Hydrolyse les proteïnes en acides aminés libres. Avant utilisation elle est prédigérée pendant 1 heure à 37° afin d'éviter toute contamination par les nucléases.

b) Mode opératoire :

α) Extraction :

Les mouches sont homogéneïsées dans le tampon d'extraction (7 ml pour 1 gr de mouches) à l'aide d'un mortier. On aide la lyse en portant le broyat à 60° pendant 10 minutes en agitant modérément. On ajoute du Clo4Na à une concentration finale de 1 M, on laisse reposer 5 minutes à la température ambiante et on ajoute un volume égal de chloroforme isoamyl alcool (24/1). On agite la solution pendant 30 minutes à 4°C et on récupère la phase aqueuse après une contrifugation à 5000 g pendant 20 minutes. Cette phase aqueuse subit à nouveau une ou deux extractions au chloroforme isoamyl alcool. Le DNA est enfin précipité en y ajoutant deux volumes d'éthanol absolu (MERCK) refroidi à-20°C,

récupéré par centrifugation puis redissous dans un petit volume de 0,1 x SSC

A ce stade, le DNA est fortement coloré, on le reprécipite une deuxième fois à l'alcool absolu et on récupère le précipité comme précédemment dans un petit volume de 0,1 x SSC. Cette opération réduit l'intensitéde la coloration.

β) Purification :

L'ADN obtenu est probablement contaminé par des ARN, des proteïnes et des polysaccharides.

A la solution d'ADN dans 0,1 x SSC, on ajoute 150 µgrs/ml de ribonucléase pancréatique et on incube 4 heures à 37°C. On fait agir ensuite l'α amylase (250 µgrs/ml) à 37°C pendant 45 minutes. Enfin pour éliminer les proteïnes contaminantes, la ribonucléase et l'α amylase, on incube la solution pendant 6 heures à 37°C en présence de pronase (200 µgrs/ml).

La pronase est à son tour éliminé par deux traitements successifs, soit au phénol, soit au chloroforme-isoamyl alcool (v/v).

Le DNA est précipité en ajoutant à la phase aqueuse deux volumes d'éthanol. Le précipité obtenu est encore coloré et pour éliminer les pigments, l'ADN est purifié sur une colonne d'hydroxyapatite.

Y) Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite :

L'hydroxyapatite est un précipite de phosphate de calcium obtenu en faisant réagir le phosphate disodique et le chlorure de calcium (TISELIUS et Coll. 1956). Elle a la propriété de fixer les polynucléotides à une faible concentration en sel. Il y a une interaction électrostatique entre les groupements phosphates des acides nucleïques et les ions Ca^{++} de l'hydroxyapatite (BERNARDI 1969). L'élution se fait avec un tampon phosphate pH 6,8 : On augmente la compétition entre les groupements phosphate (Po4) de l'ADN et ceux du tampon en augmentant au fur et à mesure la concentration de ce dernier.

La chromatographie se fait à la température ordinaire. L'échantillon d'ADN dissous dans le tampon phosphate 0,1 M pH 6,8

est fixé sur une colonne d'hydroxyapatite préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 0,1 M. L'élution de l'ADN se fait en augmentant progressivement la concentration du tampon phosphate.

B - Extraction de l'ADN à partir des glandes salivaires et des disques imaginaux :

Nous avons utilisé la technique décrite par SPEAR et GALL (1973). Les tissus fixés sont lavés avec 1 x SSC pour éliminer les traces d'alcool. Ils sont ensuite traités par la ribonucléase pancréatique à une forte concentration, (1 mgr/ml) pendant une heure à 37°C. On élimine la ribonucléase en lavant soigneusement plusieurs fois les tissus avec 1 x SSC. On resuspend les tissus lavés dans un tampon tris-Hcl 0,05 M, pH = 8,4, 0,1 M EDTA, 0,05% Sarkosyl (Sodium n-lauryl sarcosinate, Geigy NL 30) contenant 200 µgrs/ml de pronase prédigérée. La suspension est agitée pendant 18 heures à 50°C. Les disques imaginaux sont complètement lysés après 2 à 3 heures ; par contre les glandes salivaires, plus résistantes nécessitent un broyage supplémentaire.

Pour éliminer les protéines incomplètement digérées et la pronase, le lysat est traité avec un volume de phénol saturé avec 1 x SSC. L'émulsion phénolique est agité 30 minutes et la phase aqueuse est séparée par centrifugation (5000 g pendant 20 minutes). Pour éliminer les traces de phénol pouvant contaminer la solution d'ADN on la dialyse contre 0,1 x SSC pendant 24 heures à 4°C en changeant une fois le tampon de dialyse.

Avec cette technique, on arrive à extraire 1 µgr d'ADN à partir de six à dix cerveaux et disques imaginaux et 1 µgr d'ADN à partir de 25 à 30 paires de glandes salivaires.

VII - DOSAGE DE L'ADN :

On arrive à doser l'ADN dans des extraits réalisés à partir de mouches entières ou d'organes en assez grande quantité, en mesurant la densité optique à 260 nm. On admet qu'une unité de densité optique, pour un trajet optique de 1 cm correspond à 50 µgrs/ml. Les rapports

des valeurs de densité optique à 260 nm et 280 nm donnent comme pour les ARN, une appréciation de la pureté de la solution. Un rapport 260/280, compris entre 1,8 et 1,9 indique un extrait relativement pur. Mais cet ADN ne peut être considéré comme parfaitement purifié à cause de la présence de contaminants en quantité non décelable.

En ce qui concerne l'ADN extrait des glandes salivaires ou des cerveaux il est souvent difficile de se fier à la densité optique mesurée à 260 nm pour le doser. Les quantités extraites sont généralement très faibles et la pureté de l'extrait n'est certainement pas parfaite. Pour pallier cette difficulté, on a utilisé l'Ultracentrifugation analytique à l'équilibre, en gradient de chlorure de césium (Cs Cl) (Ultracentrifugeuse Beckman).

Un volume connu de la solution d'ADN à doser est mélangé avec une quantité connue d'ADN de micrococcus lysodeïcticus (ρ = 1,732 grs/Cm^3) choisi comme référence. Le chlorure de césium est ajouté jusqu'à l'obtention d'une densité finale de 1,7 grs/Cm^3. Le mélange est centrifugé pendant 20 heures à 44 770 tours/minute. Les clichés sont traduits en courbes à l'aide d'un microdensitomètre Joyce-loebl ; le rapport des surfaces correspondant aux deux types d'ADN permet de déterminer la quantité d'ADN de Drosophile contenue dans l'aliquote soumise à l'Ultracentrifugation analytique.

VIII - HYBRIDATION MOLECULAIRE ADN-ARN :

La technique utilisée est celle décrite par GILLESPIE et SPIEGELMAN (1965). Elle comprend principalement :

- La dénaturation de l'ADN,
- La fixation de l'ADN dénaturé sur les filtres de nitrocellulose,
- L'hybridation de l'ADN fixé avec de l'ARN radioactif,
- Elimination de l'ARN non hybridé.

a) Dénaturation de l'ADN :

L'ADN peut être dénaturé soit à haute température (100°C pendant 10 minutes) soit à pH alcalin (pH>12) ; nous avons choisi la

dénaturation alcaline. La solution d'ADN dans 0,1 x SSC est amenée à pH 13 par addition de soude 1 N. Au bout de 10 minutes on neutralise par addition d'acide chlorhydrique 1 N. Après neutralisation on refroidit rapidement jusqu'à 0°C et on ajuste la concentration saline à 6,7 x SSC et celle de l'ADN à un nombre entier de µgrs/ml (généralement 5 à 10 µgrs/ml).

La dénaturation alcaline présente l'avantage de ne pas dépendre de la concentration en ADN et en sels. En outre, il est plus commode de stopper l'action de la soude.

b) Fixation de l'ADN sur les filtres de nitrocellulose :

L'ADN dans 6,7 x SSC est filtré lentement à travers des membranes de nitrocellulose ("Sartorius" 0,45 µ, 13 mm ou 24 mm de diamètre). Les filtres sont préalablement imbibés pendant quelques minutes dans 6,7 x SSC.

Le filtrat recueilli est analysé pour déterminer la quantité d'ADN fixé sur les membranes. La fixation est assez variable, elle est de l'ordre de 75 à 95%.

Les filtres sont rincés avec 6,7 x SSC, séchés quelques heures à la température ambiante (2 à 4 heures), et placés ensuite à 65°C pendant 12 à 18 heures.

Des filtres témoins sont préparés parallèlement, dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution d'ADN par une solution de 6,7 x SSC.

c) Hybridation ADN-ARN :

L'hybridation est faite soit à haute température : 65°C pendant 16 heures (GILLESPIE et SPIEGELMAN 1965), soit à la température de 40°C en présence d'Urée 8 M (KOURILSKY et Coll. 1970).

α) Hybridation à 65°C :

Elle est réalisée dans des flacons de scintillation en verre.

Les flacons sont bouchés pour éviter l'évaporation et placés pendant 16 heures à 65°C. Les membranes sont ensuite lavées avec 100 ml de 2 x SSC.

β) Hybridation à 40°C en présence d'Urée :

Pour les hybridations avec l'ADN extrait des glandes salivaires et des disques imaginaux nous avons utilisé la technique décrite par KOURILSKY et Coll. (1970).

Les filtres chargés d'ADN sont placés dans les flacons de scintillation en présence de 1 ml de 2 x SSC contenant de l'Urée 8 M et de l'ARN radioactif. La dissolution de 717 mgrs d'Urée ultra pure (MANN ou MERCK) dans 1 ml de 3 x SSC donne 1,5 ml de 2 x SSC, Urée 8 M.

L'Urée empêche la dégradation des ARN, et, l'incubation à basse température permet de réduire énormément l'hybridation non spécifique et le bruit de fond. On hybride pendant 36 heures à 40°C, en maintenant une agitation douce. Après hybridation, les filtres sont lavés dans 2 x SSC (100 ml) comme précédemment.

d) Elimination de l'ARN non hybridé :

Après lavage, les membranes de nitrocellulose sont traitées par la ribonucléase pancréatique (20 µgrs/ml dans 2 x SSC) pendant 1 heure à la température de la salle. Elles sont ensuite lavées comme précédemment avec 100 ml de 2 x SSC, séchées soit à l'air soit à 65°C.

La radioactivité des hybrides fixés sur les filtres est mesurée dans le compteur intertechnique (SL 30 ou Nuclear Chicago). Les bruits de fond sont déterminés sur les filtres vièrges ayant subi les mêmes traitements.

En hybridant des quantités variables d'ARN à une quantité fixe d'ADN on obtient une courbe de saturation Celle-ci permet d'estimer les quantités d'ADN complémentaire de l'ARN radioactif testé.

La technique d'hybridation moléculaire ADN-ARN permet de savoir en outre, si deux types d'ARN sont compémentaires d'une même région de l'ADN ou de deux régions distinctes. On réalise pour cela des expériences d'hybridation compétitive : Aux mélanges d'hybridation ADN et des quantités croissantes du premier type d'ARN non radioactif, on ajoute une quantité saturante, fixe, du second type d'ARN, marqué au tritium. Si le pourcentage d'hybridation diminue au fur et à mesure que les quantités d'ARN non radioactif augmentent, on peut conclure que les deux types d'ARN sont compétitifs et se fixent sur la même région compémentaire de l'ADN.

IX - MARQUAGE DES ARN ET DES DES PROTEINES POUR L'ETUDE DE LEUR SYNTHESE :

1° - Marquage des organes in "vitro" :

Trois types d'organes ont été utilisés : les ovaires les testicules et les glandes salivaires. Les organes sont disséqués dans une goutte de solution physiologique (Ringer), placés sous huile de paraffine. Ils sont incubés par groupe de 20 à 25 dans la même solution Ringer contenant de l'Uridine -5-^{3}H (0,5 mCi/ml)ou de la leucine ^{14}C (20 à 30 µCi/ml). La durée d'incubation est de 30 minutes à 25°C. Les organes sont ensuite rincés avec quelques gouttes de Ringer puis avec le tampon qui servira pour l'extraction. Ils sont conservés à -70°C jusqu'au moment de l'extraction.

2° - Marquage des organes "in vivo" :

On injecte dans l'abdomen des mouches une solution Ringer contenant de l'Uridine -5-^{3}H (0,5 mCi/ml) ou de la leucine ^{14}C. Les mouches injectées sont placées à une température constante de 25°C pendant des temps variables.

X - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE DES PROTEINES :

Le matériel utilisé est : soit les ovaires des mouches incubés in vitro dans le Ringer contenant la leucine ^{14}C (20 à 30 µCi/ml) soit les mouches entières injectées avec la même solution (in vivo).

Le matériel est broyé à froid dans un homogeneïseur. Le tampon d'extraction contient : Tris-HCl (2,3. Io^{-2}M), Na2-EDTA (1 x Io^{-2}M), pH 8,6 ; Ce tampon est supplémenté avec du β mercaptoethanol 5.Io^{-3}M.

Le broyat est centrifugé à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes (Sorvall rotor SS34) afin d'éliminer les fragments cuticulaires et les débris cellulaires.

Le dosage des proteïnes ainsi que la mesure de la rédioactivité sont faits sur le surnageant.

a) Dosage des protéïnes :

La concentration protéïque des extraits est estimée en utilisant la technique de LOWRY légèrement modifiée.

A une partie de l'extrait on ajoute 5 parties du réactif suivant :

50 ml de carbonate de sodium à 2% dissous dans NaoH 0,1 N,
0,5 ml de sulfate de cuivre à 1%,
0,5 ml de tartrate de sodium à 2%.

Après agitation, le mélange est laisé 10 minutes à la température ambiante. On y ajoute alors 0,5 volume de réactif de Folin dilué (1/1) avec de l'eau. Attendre 60 minutes à l'abri de la lumière et lire à 600 nm. On se réfère à une gamme d'albumine sérique (de 50 µgrs à 750 µgrs).

b) Mesure de la radioactivité (MANS et Coll. 1961) :

Une fraction de l'extrait protéïque (très concentré) est appliquée sur une rondelle de papier Whatman 3 MM et séchée à l'air chaud pendant 15 minutes.

- Les filtres sont ensuite trempés pendant 60 minutes dans de l'acide trichloréacétique (TCA) 10% contenant 0,1 M d'acide aminé froid puis subissent les manipulations suivantes :

- Traitement au TCA 5% pendant 15 minutes,
- Traitement pendant 30 minutes à 90°C dans du TCA 5% pour extraire les ARN et les acides aminés,
- Rinçage dans du TCA 5%,
- Traitement à l'alcool-Ether (1/1) durant 30 minutes à 37°C pour éliminer le TCA et les lipides,
- Lavage à l'alcool-ether,
- Lavage à l'ether pur (15 minutes à la température ordinaire suivi d'un séchage à l'air,
- Les filtres secs sont mis dans des fioles à scintillation pour déterminer la radioactivité de chacun d'eux,
- Le bruit de fond est déterminé sur des filtres témoins ayant subi les mêmes traitements.

XI - EXTRACTION ET ETUDE DU PROFIL RIBOSOMAL : BOSHES (1970)

a) Extraction des polysomes et ribosomes :

On suspend un gramme de mouches dans 20 ml d'une solution A contenant 0,01 M Mg Cl2, 0,01 M Tris-HCl (pH.7,6), 0,05 M KCl, 0,004 M DDT (Dithiothreitol), à laquelle on ajoute 0,25 M de saccharose et 1% de Triton X100. On broie doucement le mélange à 4°C en utilisant un homogeneïseur en verre avec un piston en Teflon.

Après centrifugation du broyat à 10 000 g pendant 30 minutes, 4 ml de l'extrait sont mis sur un gradient formé de deux coussins de saccharose de concentration différente :

Au fond du tube 2 ml de saccharose 1,5 M dans la solution A.

Au milieu 3 ml d'une solution de saccharose 0,5 M dans A.

En haut du tube 4 ml d'extrait dans la solution A.

La centrifugation a lieu dans des tubes de propylène. Elle est faite à 105 000 g pendant 150 minutes. (Centrifugeuse Spinco Modèle L et rotor R 40).

Après élimination du surnageant, le précipité est récupéré dans 1 ml de la solution A.

b) Analyse des ribosomes et des polysomes sur un gradient de densité de saccharose :

Le gradient de saccharose utilisé est un gradient linéaire 10-40%. Il est recommandé de le fabriquer au moins 2 heures avant la centrifugation.

L'extrait (ribosomes + polysomes) est centrifugé pendant une heure à 4°C à 40 000 tours/minute dans le rotor SW 41.

Des fractions de 0,5 ml sont recueillies manuellement et lue à 260 nm. La radioactivité est mesurée sur la partie TCA précipitable de chaque fraction.

XII - TRADUCTION"IN VITRO":

a) Isolement des ribosomes et des fractions enzymatiques :

La technique est celle décrite par WEIDELI (1971). Les tampons sont les suivants :

- Tampon A :

Tris-H 1 0,05 M (pH : 7,8) ; KCl 0,025 M ; MgCl2 0,011 M ; N H4 Cl 0,01 M ; 2 Mercaptoéthanol 0,004 M ; Saccharose 0,25 M ; EDTA 0,0001 M.

- Solution B :

Saccharose 0,9 M ; MgCl2 0,003 M ; KCl 0,025 M ; et EDTA 0,1 M.

- Solution C :

Milieu A + PTC 0,005 mM ; DTT 0,004 M ; triton X100 1%.

Le protocole utilisé est représenté dans le schéma de la figure (1).

b) Mélange réactionnel :

Le mélange réactionnel permettent de tester l'incorporation de la phénylalamine (C^{14}) en présence du messager artificiel poly (U) comprend :

Pour un volume final de 1 ml de tampon A :

- Ribosomes 2,4 mgrs à 4 mgrs ; selon les expériences,
- Enzyme (pH 5,3) 6 mgrs,
- Enzyme (So4(NH4)2) 0,5 mgrs
- ATP 2 µM
- GTP 0,25 µM
- PEP 5 µM
- Pyruvate Kinase 24 µgrs
- PTC 0,005 µM
- ARN de transfert d'Esherichia Coli 250 µgrs (fourni par le Dr. WALLER J.P.)
- Poly (U) 200 µgrs
- (^{14}C) Phénylalamine 1 µCi (350 mC/mM).

Dans certains cas on a testé l'incorporation en utilisant les enzymes du surnageant provenant d'E. Coli.

La concentration des enzymes ainsi que celle des ribosomes est déterminée en utilisant la méthode de LOWRY décrite dans ce chapitre.

La radioactivité est mesurée sur le précipité au TCA en appliquant la technique déjà décrite ci-dessus.

FIGURE_1_

Isolement des ribosomes et des fractions enzy-

-matiques: Pour 1 gr de larves ou d'adultes

Homogénéiser pendant 2' à 0°C dans 2,5 ml de milieu C.

↓

Centrifugation 15 000g(15 minutes)

Surnageant — précipité (jeté)

↓

+ 1 volume milieu B

↓

Centrifugation 105 000 g (60')
dans rotor R 40

Surnageant
+ 2,5 vol B
ajuster pH 5,3
laisser 30 min. à 0°C

- centrifugation 6 000 g (15')

précipité
- Suspendre dans 0,5 ml de desoxycholate de Na à 0°C
- laisser 10' à -4°C
- ajoute 2,5 ml A + 2 ml B

↓

Centrifugation 105 000 (60')

précipité — Surnageant (jeté)

- suspendre dans 1 ml A
- ajouter 4 ml B

↓

Centrifugation 105 000 (60')

Ribosomes — Surnageant (jeté)

(dissoudre dans A)

Surnageant

-+4 volumes Sulfate d'ammonium saturé

↓

Centrifugation 10 000 g (20')

↓

Précipité
- reprendre dans tampon A et dialyser contre tampon A (120 min.)

↓

Enzymes So4(NH4/2
Conserver à -20°C dans tampon A.

Précipité
- suspendre dans 0,01 M d'acétate de sodium pH 5,3

↓

Centrifugation 6 000 g (15')

↓

Enzyme pH 5,3
Conserver le précipité à -20°C et le suspendre dans tampon A juste avant utilisation

- PARTIE I -

DETERMINATION QUANTITATIVE DES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES ET RIBONUCLEIQUES A DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT : COMPARAISON ENTRE UN MUTANT BOBBED (yvbb) PARTIELLEMENT DEFICIENT EN ADNr ET LA SOUCHE SAUVAGE bb^+ (OREGON R).

A - INTRODUCTION

Les mutations au locus bobbed (poils courts et fins, abdomen déformé et développement retardé) sont dans la plupart des cas, dûes à une déficience en ADN hybridable à l'ARN ribosomal. La question se pose donc de savoir si cette déficience en ADNr a une répercussion sur la synthèse des ARNr au cours du développement.

MOHAN et RITOSSA (1970) ont montré que les oeufs pondus par les mouches bobbed ont une quantité normale d'ARN ; cependant le nombre d'oeufs pondus est réduit. Cette normalisation de la quantité d'ARN est probablement le résultat d'une oogénèse lente.

En ce qui concerne les adultes, MOHAN et RITOSSA (1970) par des études "in vitro" du taux de synthèse des ARN ribosomaux dans les ovaires, et WEINMANN (1972) par des études "in vivo" portant sur l'animal entier, ont montré que les mutants bobbed synthétisent moins d'ARN ribosomal 28S et 18S que la souche sauvage bb^+.

Il nous a paru intéressant d'estimer les quantités d'ARN - en majorité de type ARN ribosomaux (90 %) - à tous les stades successifs du développement c'est à dire de l'embryogénèse jusqu'à l'émergence de l'Imago et de les comparer à la quantité d'ADN et au poids.

B - CROISEMENTS UTILISES ET INDIVIDUS ETUDIES :

1) Souches de Drosophiles :

- souche sauvage Oregon R de Paris

- Souche mutante provenant de la Collection d'Urbana :

Le chromosome X porte les mutations y, v, bb ; le chromosome Y porte la duplication B^S et une mutation bb. La mutation bobbed (yvbb) est dûe à une déficience en ADNr ; elle présente 0,055% d'ADN hybridable à l'ARNr 28S et 18S. La mutation bobbed (B^SYbb) se comporte également comme une déficience en ADNr, elle est équivalente du point de vue phénotypique à la mutation bobbed (yvbb).

2) Individus étudiés :

Etant donné que le locus bobbed est localisé à la fois sur les chromosomes X et Y, l'étude d'une mutation bobbed donné n'est possible que chez les femelles homozygotes bb/bb. Or la distinction entre larves mâles et femelles, basée sur la différence de volume et de forme des disques imaginaux des gonades, n'est aisée qu'à partir du troisième stade larvaire. Des marqueurs génétiques visibles chez la larve pourraient être utilisés, tels que les marqueurs w et y qui décolorent respectivement les tubes de MALPIGHI et les crochets buccaux de la larve. Cependant il est pratiquement difficile de distinguer l'effet de ces marqueurs sur des larves de premier stade ou du début du deuxième stade. Des essais tentés dans ce sens avec le marqueur y nous ont permis d'estimer de 10 à 20 % l'erreur commise. De plus, il n'y a pas de marqueur génétique phénotypiquement visible sur les oeufs. Pour pallier ces difficultés et pouvoir comparer à tous les stades du développement un génotype bobbed et un génotype sauvage (bb^+), nous avons substitué à l'Y de la souche yvbb un Y portant une mutation bobbed (B^SY bb). Nous avons renoncé à séparer mâles et femelles avant le troisième stade larvaire. Le tableau -2- présente les génotypes et phénotypes des individus étudiés.

- Récolte des oeufs :

150 à 200 femelles et autant de mâles de type parental approprié, âgés de 3 à 7 jours sont placés dans des tubes de ponte qui contiennent une plaque recouverte d'une couche de milieu à base de levure et de vinaigre (c.f. chapitre Matériel et Méthodes pour la composition de ce milieu de ponte).Tous les oeufs pondus pendant cet intervalle de temps sont pris pour faire une estimation moyenne. Une fois ramassés, les oeufs sont lavés plusieurs fois à l'eau distillée. Après avoir été pesés, ils sont stockés à -70°C.

- Récolte des larves, pupes et adultes synchrones :

Pour obtenir des individus synchrones, les lames de ponte sont remplacées toutes les 30 minutes de sorte que les oeufs d'un même lot sont d'âge identique à plus ou moins 30 minutes près. Les oeufs pondus sont ramassés et transférés dans un tube contenant du milieu d'élevage standard frais.

TABLEAU - 2 -

Individus utilisés pour la détermination quantitative des acides nucléiques

Souche sauvage ♀ bb^+/bb^+ X ♂ bb^+/Ybb^+		
Individus	Oeufs, 1er et 2ème stade larvaire	3ème stade larvaire, pupes et adultes
Génotype	♀ bb^+/bb^+ , ♂ bb^+/Ybb^+	♀ bb^+/bb^+
Phénotype	♀ et ♂ $[bb^+]$	♀ $[bb^+]$

Souche bobbed ♀ yvbb/yvbb X ♂ yvbb/B^SYbb		
Individus	Oeufs, 1er et 2ème stade larvaire	3ème stade larvaire, pupes et adultes
Génotype	♀ yvbb/yvbb, ♂ yvbb/B^5Ybb	♀ yvbb/yvbb
Phénotype	♀ et ♂ [bb]	♀ [bb]

Les larves sont récoltées en ajoutant au milieu de culture une solution de saccharose (50 %) ; les larves ayant une densité plus faible flottent. Elles sont lavées comme précédemment à l'eau distillée, pesées et stockées à froid à -70°C. A partir du troisième stade larvaire, les larves sont triées sous la loupe binoculaire afin de séparer les femelles des mâles.

Les pupes sont ramassées, lavées comme précédemment, pesées et stockées à -70°C.

Les adultes d'âge déterminé sont triés puis pesés et stockés à -70°C.

C - RESULTATS

Chaque échantillon comporte 50 à 100 individus, et correspond à un stade défini du développement, de l'oeuf jusqu'à l'Imago. Le temps séparant la ponte de l'éclosion est de 22 heures à 23°C pour les deux souches étudiées. Il n'y a donc pas de retard durant l'embryogénèse pour la souche bobbed.

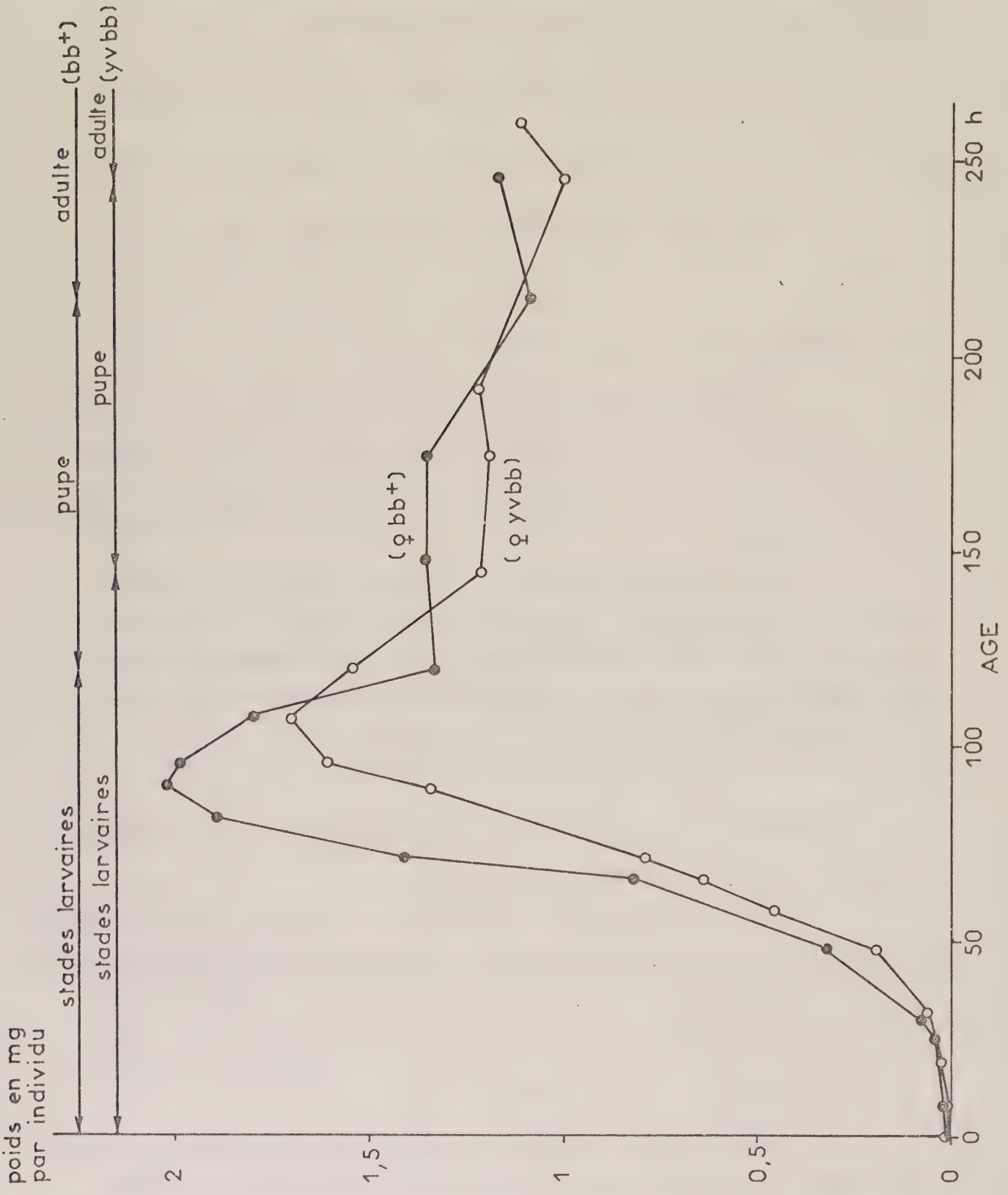
Chez la souche sauvage, les premières pupes apparaissent environ 110 heures après la ponte et l'émergence imaginale se produit vers 210 heures. Pour la souche bobbed la durée du développement pour les femelles est de 240 heures, les premières pupes apparaissent à 130 heures. Les résultats obtenus concernent des mesures pondérales, et des dosages des acides nucléiques (ARN et ADN).

1) Relation entre le poids individuel et le temps de développement dans les deux souches :

Les résultats sont rassemblés dans la figure 2. Elle représente la variation du poids par individu en fonction de l'âge exprimé en heures. Le temps t = 0 correspond à l'éclosion de la larve. En dehors de la variabilité qui existe dans la durée du développement des deux souches et qui se manifeste sur la croissance pondérale, nous pouvons tirer de ces deux courbes les renseignements suivants :

- Dans les deux souches, le poids augmente rapidement au cours des deux premiers stades larvaires et d'une bonne partie du troisième stade ; la croissance se ralentit à la fin de ce dernier et l'on observe une baisse du poids par individu très sensible. Durant le stade pupal, le poids reste constant traduisant probablement une imperméabilité

Figure 2 - Variation du poids (en milligrammes) par individu en fonction du temps (en heures) de développement depuis l'éclosion de la larve jusqu'à l'émergence de l'imago.



cuticulaire (LUDWIG 1945). Le poids de l'imago jeune décroît par rapport à celui de la pupe puis augmente, reflètant une oogénèse active.

En raison du développement retardé de la souche bobbed, il est difficile d'établir une comparaison des deux courbes point par point. Quoiqu'il en soit les deux courbes montrent qu'il existe une différence de poids entre les deux souches. Celle-ci devient importante à partir du 3ème stade larvaire et persiste chez la pupe et même chez l'imago. Dans la souche témoin (bb^+) le poids maximum - 2,02 mgrs par larve - s'observe au bout de 90 heures alors que dans la souche bobbed un poids maximum de 1,71 mgrs n'est atteint qu'après 108 heures. La pupe sauvage pèse en moyenne 1,35 mgrs, la pupe bobbed ne pèse que 1,1 mgrs.

Nous pouvons clairement conclure, que la déficience en ADNr de la souche yvbb, entraîne une diminution du poids de l'animal, dûe vraisemblablement à une synthèse protéique réduite.

2) Variation des quantités d'ADN au cours du développement (Figures 3 et 4).

La figure -3- montre la variation de la quantité d'ADN en fonction de l'âge des animaux. Elle reflète bien la variabilité qui existe dans la durée du développement des deux souches. Durant le premier stade larvaire, la quantité d'ADN par larve croît très lentement ; entre les deux souches la différence n'est pas bien nette. Au cours du deuxième stade larvaire, la quantité d'ADN par individu augmente plus rapidement et l'écart entre les deux souches devient de plus en plus évident. Cette augmentation de la quantité d'ADN se poursuit au cours du troisième stade larvaire jusqu'à atteindre 0,95 µgr par larve pour la souche bb^+ à 90 heures et 0,85 µgr par larve pour la souche bobbed à 108 heures. Au cours des stades ultérieurs, les quantités d'ADN par animal restent stables jusqu'à l'émergence de l'imago.

La figure -4- représente la variation de la quantité d'ADN par mgr de tissus frais : les courbes montrent qu'au cours du premier stade larvaire, la quantité d'ADN par mgr de tissus subit une chute importante pour les deux souches. Cela peut correspondre à une prédominance de l'accroissement de la taille des cellules par rapport à leur multiplication. Durant le deuxième stade larvaire la quantité d'ADN par mgr de tissu continue à baisser mais à un rythme plus faible. Elle devient stable pendant la première moitié du troisième stade larvaire, avant de subir une légère augmentation à la fin. Cette augmentation, qui persiste

Figure 3 - Variation de la quantité d'ADN (en microgrammes) par individu en fonction du temps de développement.

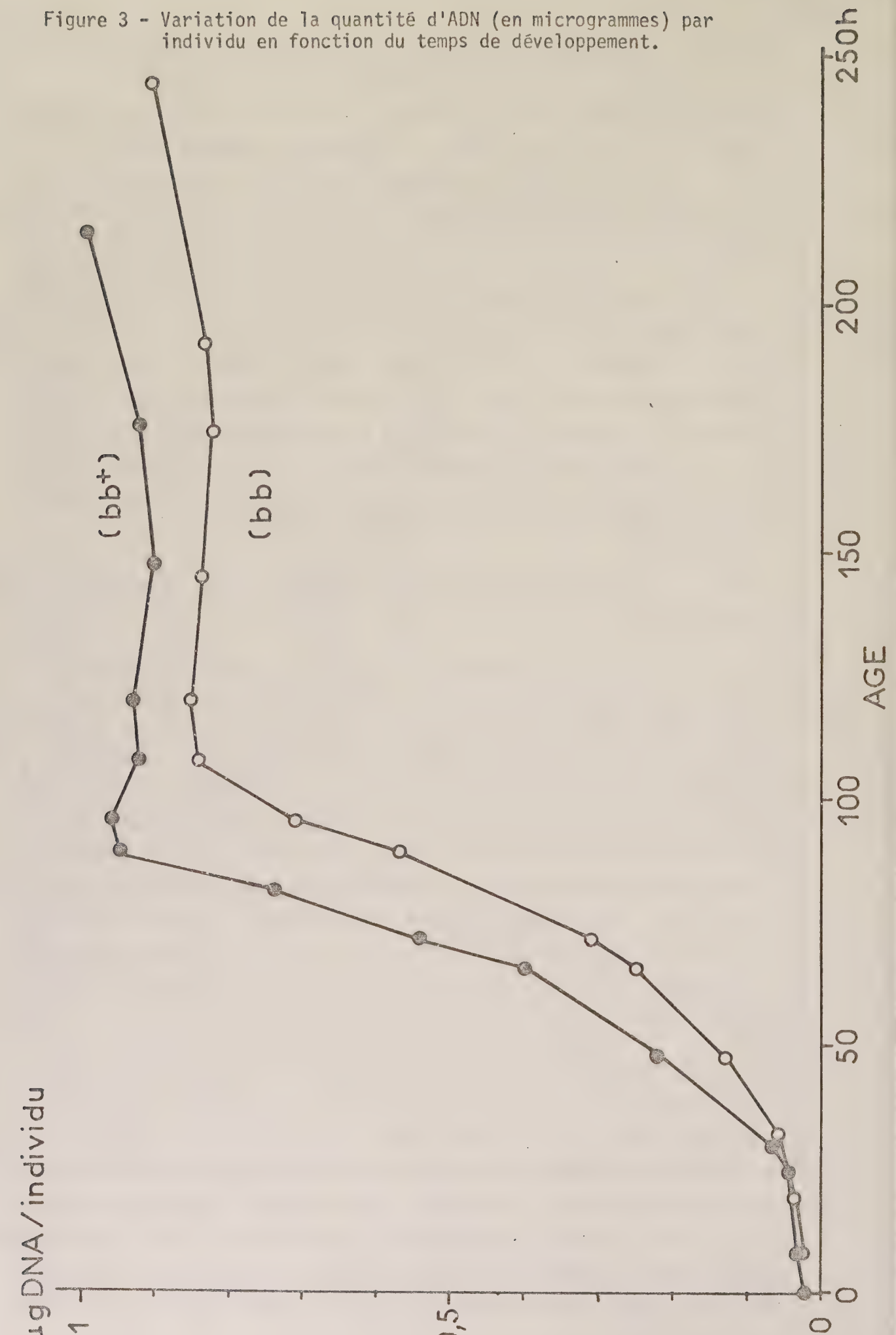
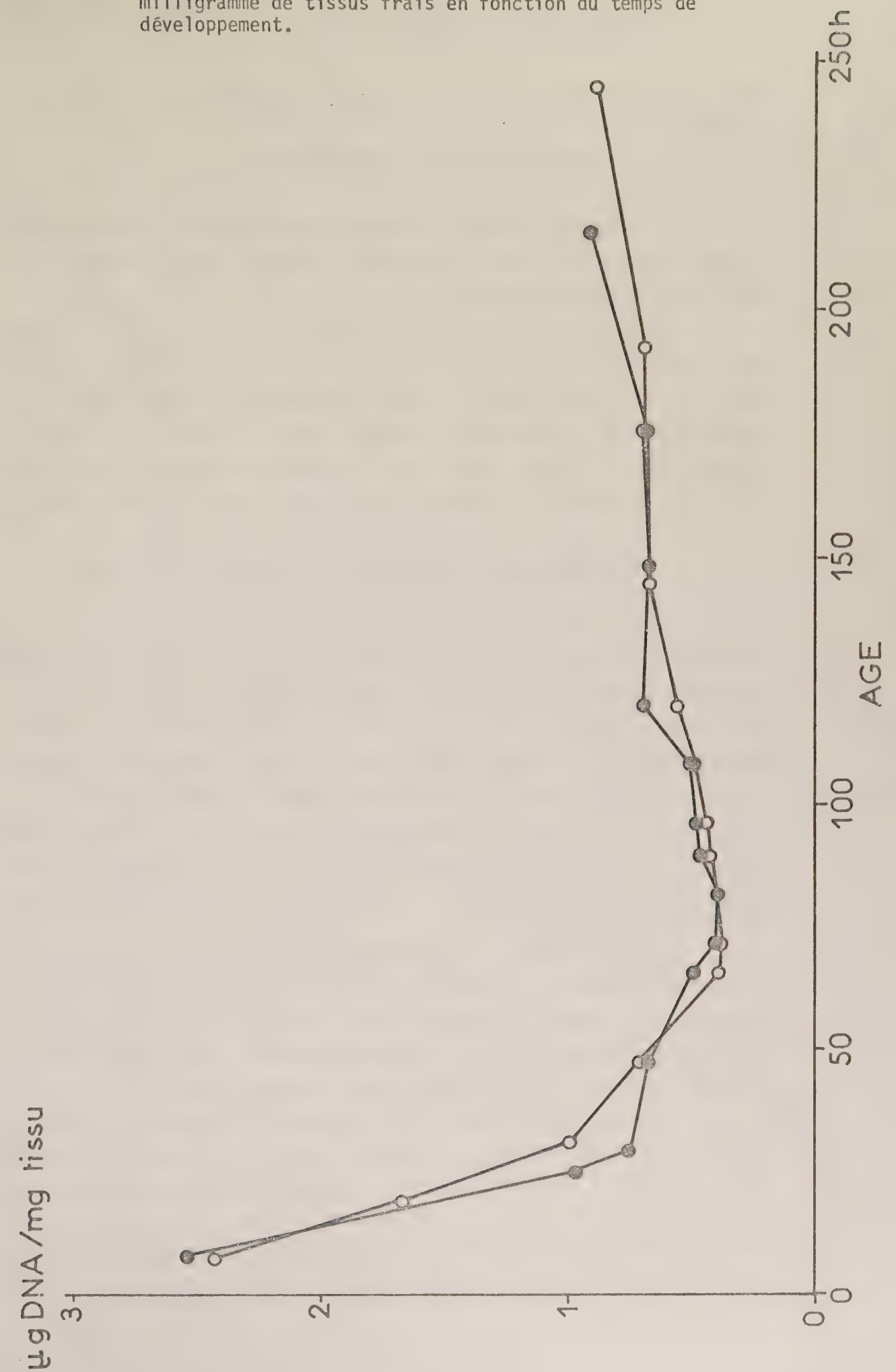


Figure 4 - Variation de la quantité d'ADN (en microgrammes) par milligramme de tissus frais en fonction du temps de développement.



dans la pupe, est dûe à la perte de poids que subit la larve avant de puper.

La comparaison des deux souches montre :

- Pendant la majeure partie du développement, les quantités d'ADN par animal sont plus faibles dans la souche bobbed que dans la souche témoin de référence (bb^+).

- Concernant les quantités d'ADN par mgr de tissu, la différence entre les deux souches est faible ou nulle. A des stades comparables - stade pupe et adulte - cette différence est probablement nulle. Ceci suggère que la différence de poids entre les individus provient non pas d'une différence dans la taille des cellules mais d'une différence dans le nombre des divisions cellulaires entre les deux souches.

3) Variation de la quantité d'ARN en fonction de l'âge.

La figure -5- montre l'évolution quantitative des acides ribonucléiques par animal au cours du développement. Les courbes représentées dans cette figure, ont une allure semblable à celle des courbes de croissance (figure 2). Qu'il s'agisse de la souche sauvage bb^+ ou de la souche mutante bb, les quantités d'ARN par animal augmentent lentement pendant le premier stade et une partie du deuxième stade larvaire ; ultérieurement ces quantités augmentent plus rapidement. A la fin de la vie larvaire, les ARN subissent une légère diminution pour atteindre un niveau stable, différent dans les deux souches. Ce niveau est maintenu durant toute la pupaison.

L'écart entre les deux courbes (bb^+ et bb) insignifiant dans la dizaine d'heures qui suit l'éclosion de la larve, augmente lentement jusqu'à 40 à 50 heures, et devient plus important dans la suite du développement larvaire. Dans la pupe et le jeune imago, les quantités d'ARN par individu sont différentes pour les deux souches.

La figure -6- montre les variations de la quantité d'ARN par mgr de tissus frais au cours du développement. Elle reflète indirectement le rapport ARN sur protéines en supposant que les protéines représentent en poids le constituant majeur de l'animal.

Les quantités d'ARN par mgr de tissus subissent une décroissance rapide au delà de la dixième heure après l'éclosion pour la souche bb^+

Figure 5 - Variation de la quantité d'ARN (en microgrammes) par individu en fonction du temps de développement.

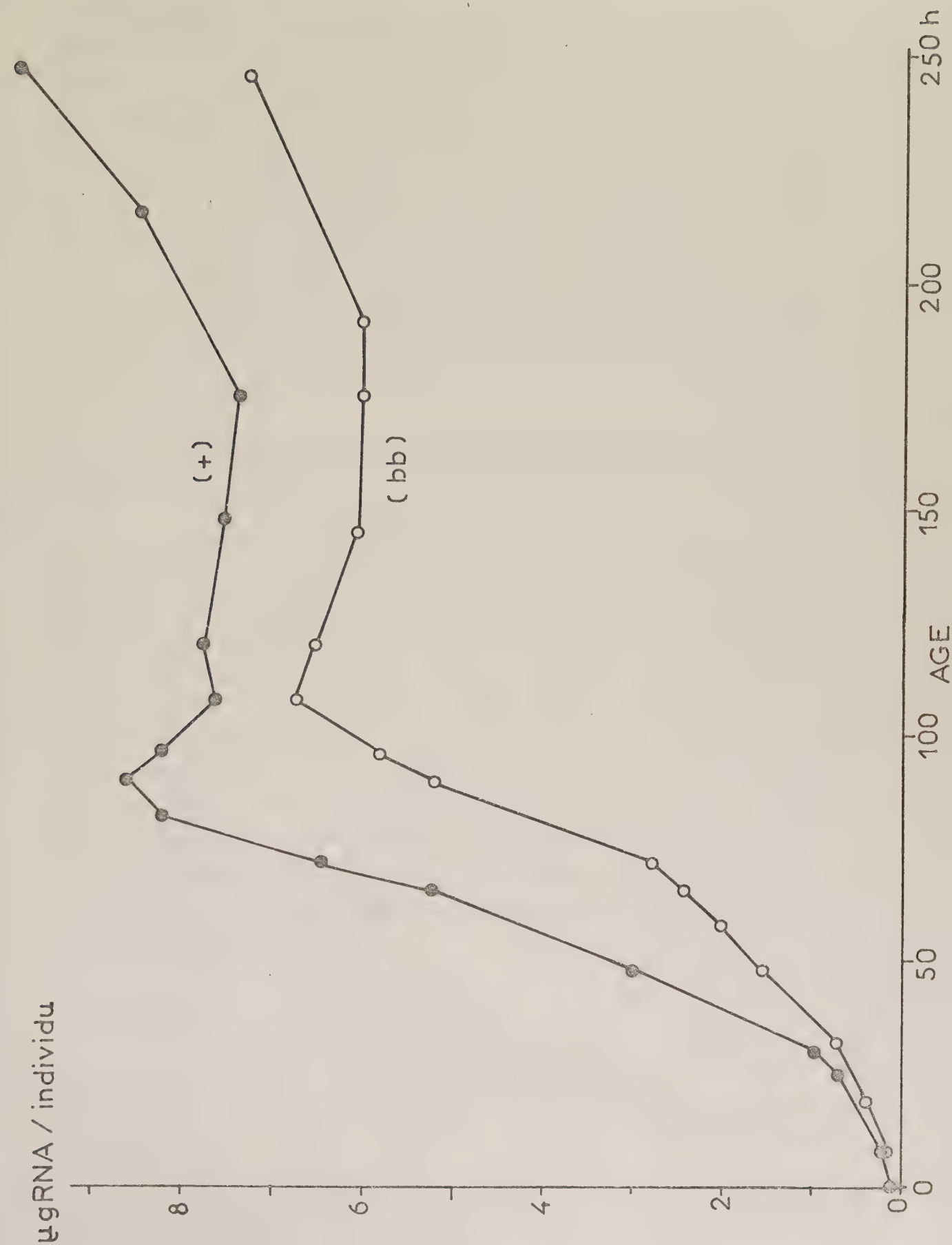
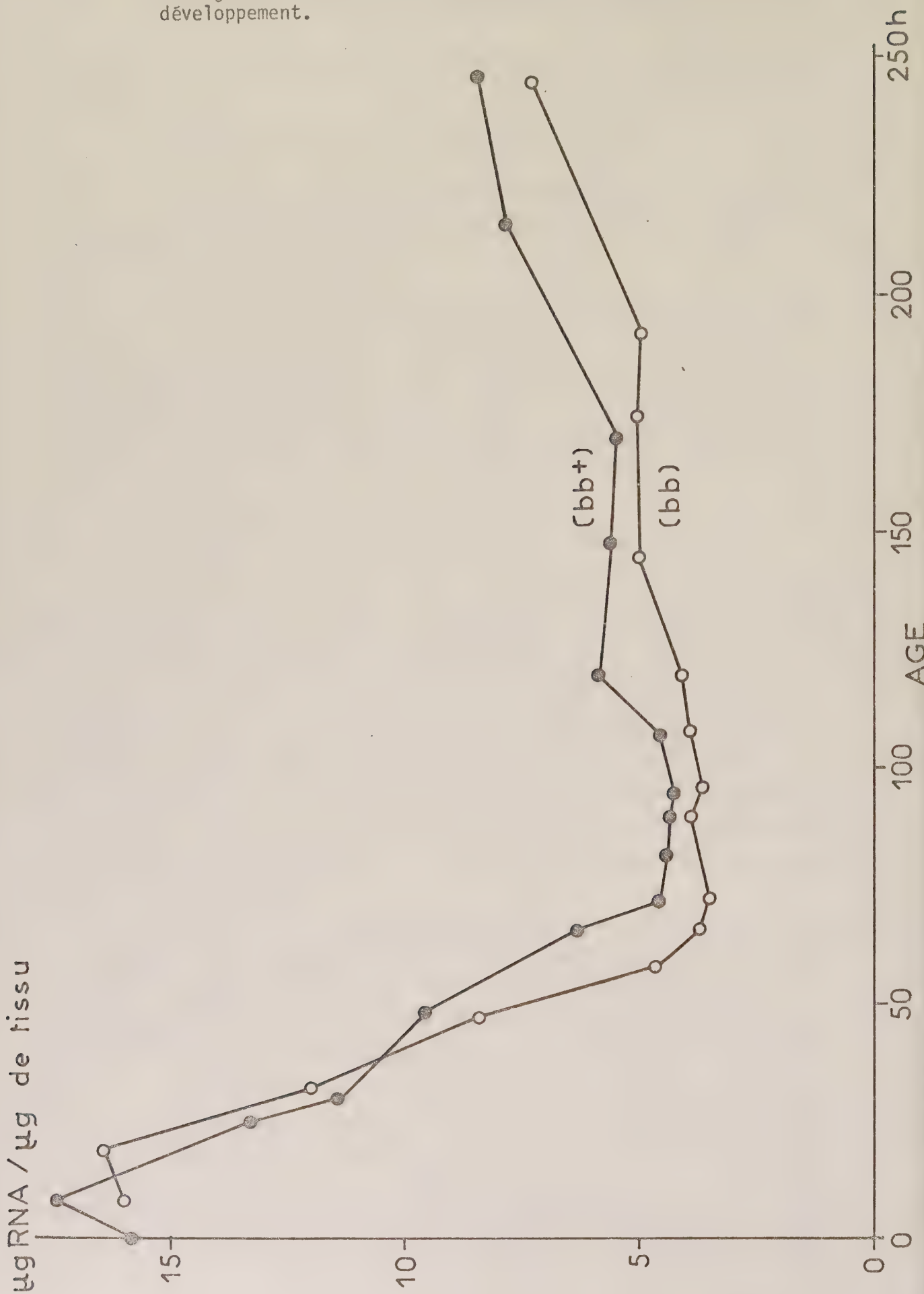


Figure 6 - Variation de la quantité d'ARN (en microgrammes) par milligramme de tissus frais en fonction du temps de développement.



et de la vingtième heure pour la souche bb. Au cours du troisième stade larvaire, et pour les deux souches, les quantités d'ARN par mgr de tissus se stabilisent à un niveau cependant plus faible pour la souche bobbed. Durant la pupaison on note une légère augmentation de la quantité d'ARN par mgr de tissus, augmentation dûe probablement à une diminution en poids de la pupe par rapport à la larve d'origine. Qu'il s'agisse de la pupe ou du jeune imago, les quantités d'ARN sont plus faibles dans la souche bobbed.

Nous remarquons que les quantités d'ARN varient très peu sinon pas au cours de la pupaison. Nous pouvons interpréter ce résultat par une balance entre la destruction des ARN ribosomaux de la larve et leur synthèse dans la pupe.

4) Variation du rapport ARN/ADN en fonction de l'âge (Figure -7-).

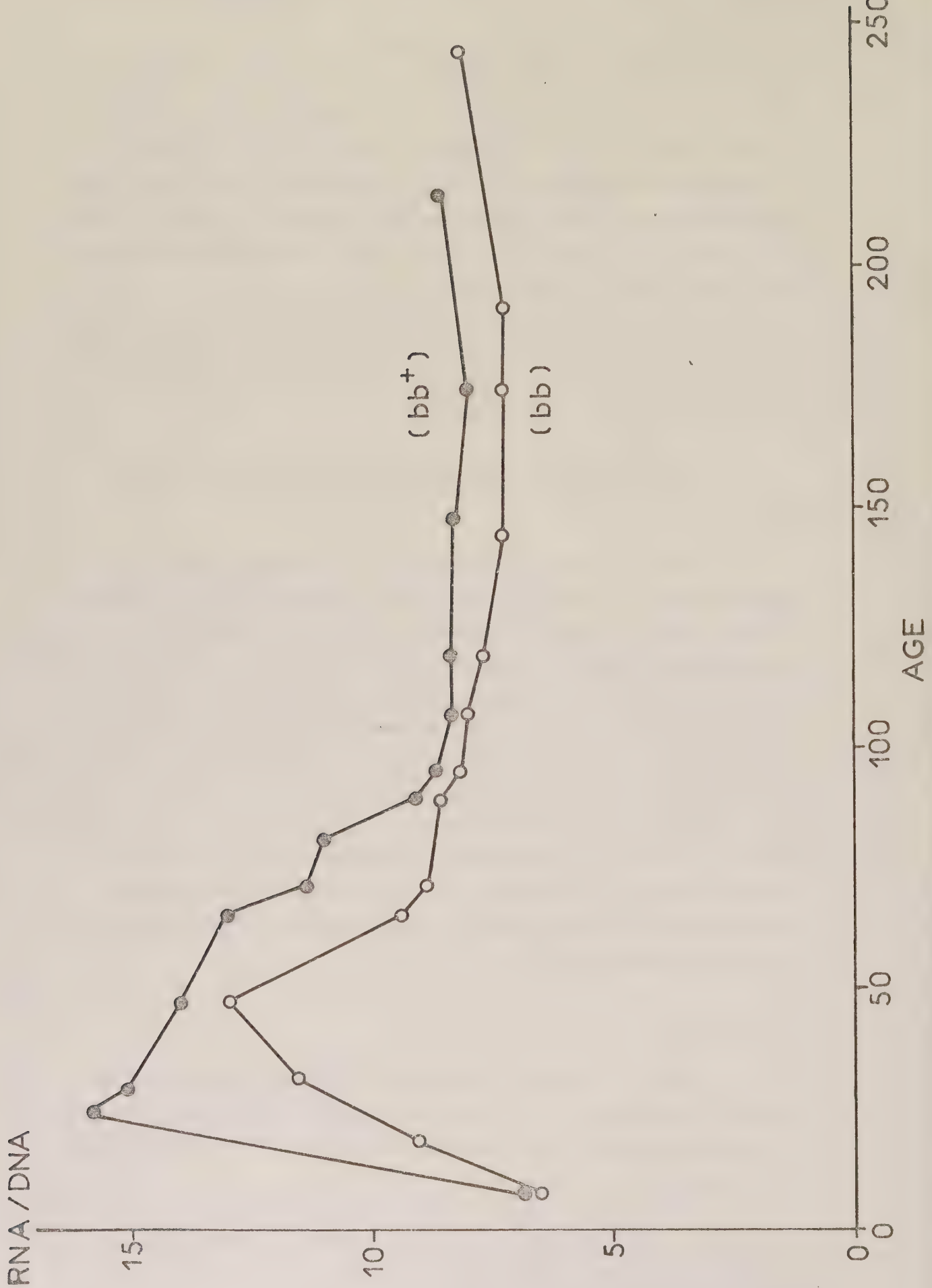
Pour la souche de référence bb^+, la valeur maximale du rapport ARN/ADN est atteinte environ 25 à 30 heures après l'éclosion ; la souche bobbed présente une valeur maximale plus basse qui est atteinte seulement 32 à 48 heures après l'éclosion. Le rapport diminue ensuite pour atteindre un niveau constant vers 96 à 100 heures pour le témoin bb^+ et 120 heures pour le mutant bobbed. La valeur de ce rapport est sensiblement plus basse pour la souche bobbed entre 20 heures et 90 heures après l'éclosion. Aux stades ultérieurs et jusqu'à l'émergence imaginale l'écart devient faible. Il est donc clair que cet écart, important au début du développement ne peut être attribué qu'à une synthèse d'ARN plus faible chez la souche bobbed. Cette réduction affecte sûrement les ARN ribosomaux qui représentent environ 85 à 90 % des ARN totaux de la cellule.

D) DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons établi une comparaison entre un mutant bobbed yvbb, et la souche sauvage de référence bb^+ en termes de croissance pondérale et de quantités d'ARN et d'ADN à divers stades du développement.

En ce qui concerne les techniques utilisées, il est important de noter que certains produits autres que l'ARN ou l'ADN peuvent réagir soit avec le réactif orcinol, soit avec le réactif diphényl-amine pour donner une coloration parasite. Ainsi les hexoses et polysaccharides

Figure 7 - Variation de la valeur du rapport ARN/ADN en fonction du temps de développement.



donnent avec l'orcinol une coloration brune. Ce type de coloration n'a jamais été observé dans nos dosages. D'autre part, l'acide urique réagit de la même façon que l'ARN;BERNARD et coll. (1963) ont montré que les quantités d'acide urique varient au cours du développement et atteignent une forte valeur au niveau de la pupe. Dans tous les dosages où l'acide urique pourrait avoir une interférence avec l'ARN, nous avons au préalable dialysé les extraits d'ARN contre le triethanolamine.

Des colorations parasites peuvent intervenir également dans les dosages d'ADN. Le ribose, les sucres, et les substances protéiques réagissent avec le diphénylamine. D'après BURTON(1956) il faut 5 mgrs d'ARN pour produire la même coloration que 0,011 mgrs d'ADN. Or les courbes de la figure -7- montrent qu'il y a au maximum 16 fois plus d'ARN que d'ADN dans les larves, aussi l'interférence des traces d'ARN pouvant contaminer la fraction ADN est très négligeable. BURTON signale d'autre part, que les sucres ne produisent des colorations appréciables qu'à des concentrations élevées.

Quant aux substances protéiques, FINAMORE (1957) a montré qu'elles forment une sorte de voile coloré lorsque les tubes de dosage sont laissés à froid ; les conditions de la réaction (30°C) empêchent les substances protéiques d'interférer avec l'ARN.

Il est possible que les valeurs présentées dans ce travail soient entachées d'une très faible erreur ; mais celle-ci n'affecte probablement pas son aspect strictement comparatif.

MOHAN et RITOSSA (1970) ont étudié les quantités d'ARN et d'ADN dans la pupe et l'adulte et ceci pour différents mutants bobbed connus pour être déficients en ADNr. Le rapport ARN/ADN déterminé dans ces souches est similaire à celui déterminé dans la souche sauvage de référence bb^{+}.

La faible divergence existant entre nos résultats et ceux présentés par MOHAN et coll. peut être due :

Soit à une différence réelle existant entre les souches étudiées par ces auteurs et celle étudiée dans ce travail.

Soit aux techniques utilisées pour estimer les quantités d'ARN et d'ADN. En effet les quantités d'ADN par individu déterminées par ces auteurs sont nettement plus faibles que celles présentées ici. Nos estimations sont comparables à celles de NIGON et coll. (1958), CHURCH et ROBERTSON (1966) ET KIEFFER (1968). Comme nous l'avons vu

d'autre part, l'efficacité de l'extraction des ADN varie probablement d'une technique à l'autre (LINZEN et WYETT 1964).

Les résultats obtenus sur les deux souches étudiées ici, montrent qu'il existe pour chacune d'elle une relation entre la croissance exprimée en mgr par animal et les quantités d'acides nucléiques (ARN).

Dans le cas de la souche bobbed, caractérisée par une déficience en ADN hybridable à l'ARN ribosomal 28S et 18S, la croissance est lente et le poids par animal est toujours inférieur à celui de la souche sauvage ; de même on observe une diminution des quantités d'ARN et d'ADN par individu. Le rapport ARN/ADN est toujours inférieur à celui de la souche de référence, l'écart étant très important au cours des deux premiers stades larvaires et la moitié au moins du troisième stade (Figure -7-). En outre, les résultats montrent que les quantités d'ARN varient peu, sinon pas, au niveau de la pupe dans les deux souches ; et, pour expliquer ces faits nous avons proposé l'hypothèse d'un équilibre existant entre la destruction des ARNr provenant de la larve et leur resynthèse dans la pupe. En ce qui concerne le métabolisme des ARNr danns la pupe, nous n'avons pas de données bibliographiques allant à l'appui ou à l'encontre de notre hypothèse ; la fragilité de la pupe reste encore un obstacle à franchir pour une telle exploration.

Les mouches bobbed, présentent un allongement de tous les stades du développement qui semble pouvoir compenser, au moins partiellement, la réduction de la synthèse d'ARN. Cette comparaison se ferait à des degrés différents, et certaines cellules telles que les cellules des soies et celles formant les tergites abdominales, ne pourraient pas normaliser leurs quantités d'ARN ; si à leur niveau, les synthèses protéiques sont plus intenses que dans les autres cellules, ou si elles ne subissent que peu (ou pas) de retard de développement, le déséquilibre entre les quantités d'ARN disponibles et les besoins va engendrer les traits caractéristiques du phénotype bobbed. Les soies sont formées à l'origine, d'une seule cellule (trichogène) qui se développe rapidement au cours de la métamorphose (LEES et WADDINGTON 1942).

La meilleure illustration concernant la normalisation des quantités d'ARN est fournie par les oeufs pondus par des femelles bobbed. Les résultats de MOHAN et coll. (1970) obtenus en étudiant "in vitro" le taux de synthèse des ARNr dans des ovaires bobbed et des ovaires [bb^+] sauvages montrent que cette synthèse est réduite dans les ovaires bobbed.

La quantité d'ARN dans les oeufs pondus n'est cependant pas affectée par la déficience en ADNr de la mère : la mère pond plus tardivement qu'une femelle bb^+, son rythme de ponte est peu, ou pas, réduit, et il est vraisemblable que ce retard permet à la mouche bobbed de synthétiser les ribosomes nécessaires à l'oogénèse (MOHAN 1971).

De l'ensemble des résultats obtenus, un fait important à retenir est donné par la figure -7-. Sur cette figure les courbes présentant les variations du rapport ARN/ADN en fonction de l'âge, montrent un important écart, intervenant dans les premiers stades du développement larvaire (1er, 2ème et début du 3ème stade). Cette période constitue un stade "critique" pouvant avoir une incidence sur la suite du développement. En effet après l'éclosion il y a une synthèse importante d'ARN par rapport à l'ADN, qui atteint son maximum chez la souche sauvage en une vingtaine d'heures. Durant la même période, la synthèse d'ARN chez la souche bobbed est plus lente et le maximum n'est atteit que plus tard (48 heures). La valeur du rapport ARN/ADN diminue ensuite et sa diminution est plus accentuée pour la souche bobbed ; cela suggère un déséquilibre entre les synthèses d'ARN et d'ADN chez la souche bobbed.

L'existence de cette phase "critique" montre qu'une synthèse d'ARN importante, à un moment donné, est nécessaire pour préparer la pupaison et la sortie de l'adulte. Son repérage est utile pour étudier les mutants pouvant éventuellement intervenir dans la régulation de la synthèse des ARN ribosomaux.

- PARTIE II -

ETUDE DES MUTANTS BOBBED INDUITS A L'ETHYL METHANE SULFONATE : NOUVELLE CLASSE DE MUTANTS BOBBED NON DEFICIENTS EN ADN HYBRIDABLE A L'ARNr.

CHAPITRE PREMIER : SELECTION DES MUTANTS BOBBED

A - INTRODUCTION

Le taux de synthèse des ARNr dépend, et de la quantité d'ADNr par cellule (Partie I de cette thèse), et de la vitesse de transcription de cet ADNr. Notre objectif initial, était de chercher à savoir si une régulation de la transcription des gènes codant pour les ARN ribosomaux, pouvait être mis en évidence. Un mécanisme de régulation peut être mis en évidence de deux manières au moins :

- Sélection de mutations bobbed ne correspondant pas à une déficience en ADNr : il existe des indications selon lesquelles certains mutants bobbed pourraient contenir un nombre de cistrons voisin de celui de la souche sauvage (BAKER, 1971 ; RITOSSA 1968). Le phénotype bobbed dans ce cas, peut être attribué soit à une diminution de la vitesse de transcription, soit à la production d'ARNr modifié.

- Sélection de révertants de mutations bobbed connues pour avoir une déficience en ADNr : dans le cas où ces révertants conservent la même quantité d'ADNr, la restauration du phénotype sauvage bb^+ peut correspondre à une augmentation de la vitesse de transcription. SANDLER (1970) a décrit une mutation autosomale (abo) qui aurait une action régulatrice sur la partie hétérochromatique des chromosomes sexuels (X et Y) y compris le locus bobbed.

Le premier but de ce travail est la recherche et l'étude de ces types de mutants.

Le présent chapitre décrit le protocole expérimental utilisé pour sélectionner des mutations bobbed (choix de l'agent mutagène, du

chromosome à traiter et d'un système sélectif), et les résultats obtenus, notamment, la mise en évidence de mutants non déficients en ADN hybridable à l'ARNr 28S et 18S.

B - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Il est évident que l'objectif proposé nécessite un choix bien judicieux du chromosome X à traiter, de l'agent mutagène et du système génétique permettant de cribler de telles mutations.

1) Choix des souches à traiter.

Deux souches ont été utilisées :

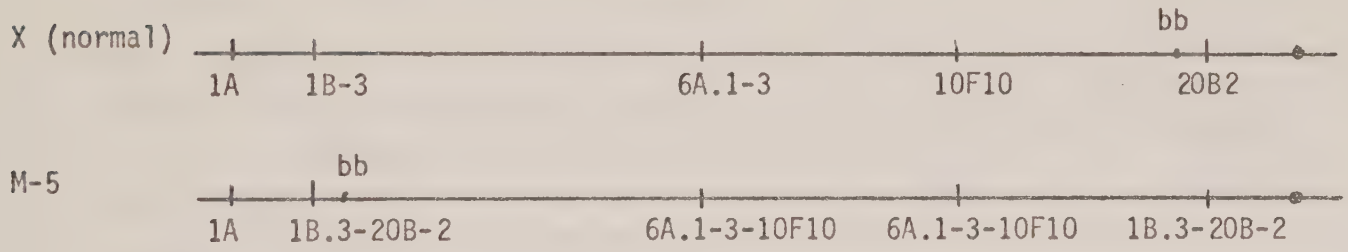
- La souche sauvage Oregon R de Paris

- La souche Muller-5 ou "Asc" : le chromosome X de cette souche présente une double inversion (SPENCER et STERN 1948) :

"Muller-5" = In(1) Sc^{S1L} Sc^{8R} + In(1)S

In(1)S = In(1) 6A.1-3 ; 10 F10-11A1

In(1)Sc^{S1L} Sc^{8R} = In(1)1B.3-4 ; 20B.D_1^L ; 20B.D_1^L 1B2-3



Cette double inversion place le locus bobbed dans une région éloignée du centromère, à l'extrémité distale. Ce chromosome est de plus marqué par les mutations sc($sc^{S1}sc^{8}$) et w^a. On appelle parfois ce chromosome le chromosome "Asc" (ou "Basc" quand il porte en plus la mutation Bar).

Les raisons qui nous ont amené à utiliser un chromosome X de structure complexe sont de deux sortes :

La région bobbed en position normale est d'observation assez difficile sur les chromosomes géants des glandes salivaires en raison

de la proximité du chromocentre. Par ailleurs on ne connait pas de gènes situés entre le locus bb et le centromère. Il est donc impossible d'encadrer la région bobbed en position normale par des gènes marqueurs. Or, l'observation cytologique précise de cette région, la possibilité de l'encadrer par des marqueurs, peuvent être ultérieurement nécessaires en particulier pour étudier la structure fine de ce locus.

2) Choix de l'agent mutagène

Plusieurs agents mutagènes, physiques ou chimiques induisent avec une grande efficacité, des mutations chez la Drosophile. Ces agents provoquent des modifications allant d'un changement d'une seule base jusqu'à une grande délétion (DEMEREC 1939 ; BIRD et coll. 1953 ; FAHMY et coll. 1957 ; SNYDER et coll. 1964).

L'éthyl méthane sulfonate, agent alkylant, induit en majorité des mutations ponctuelles chez le bactériophage T4 (KRIEG 1962) ; l'auteur arrive à la conclusion que l'EMS provoque des transitions de bases de type GC vers AT avec une haute fréquence et AT vers GC avec une fréquence faible.

En ce qui concerne la drosophile, ALDERSON (1965) a été le premier, à montrer que l'EMS est remarquablement mutagène lorsqu'il est absorbé par des adultes mâles. LIM et SNYDER (1968), étudiant cytologiquement des léthaux induits à l'EMS ne trouvent aucun léthal associé à un remaniement chromosomique (translocation ou déficience). HOTCHKIN et LIM (1968) améliorent l'efficacité d'action de l'EMS en le faisant absorber aux mouches pendant 24 heures ; ils trouvent toutefois que dans ces conditions 2,5 % des léthaux induits sur le chromosome X sont liés à des translocations. SUZUKI (1970) montre que la majorité des mutations léthales liées au sexe, induites par l'EMS, se définissent génétiquement comme mutations ponctuelles.

L'ensemble de ces données, montre, que l'agent alkylant (EMS), utilisé comme mutagène est très efficace chez la drosophile et induit en majorité des mutations ponctuelles. Nous nous sommes donc adressés à cet agent mutagène pour induire des mutations bobbed pouvant répondre à l'objectif fixé, c'est à dire touchant le mécanisme de régulation des gènes ribosomiques.

3) Choix du système de sélection

Plusieurs mutants bobbed sont décrits dans la littérature (LINDSLEY et GRELL 1968 ; RITOSSA et coll. 1966). La majorité de ces mutants correspond à une diminution plus ou moins grande de l'ADNr. A priori, le phénotype attendu des mutants bobbed recherchés, pourrait être de n'importe quel degré d'intensité allant d'un type bobbed extrême à bobbed léger. Tous ne peuvent pas être sélectionnés de la même façon. Nous avons choisi d'utiliser un système permettant de sélectionner des mutants bobbed fort.

Nous avons pris une mutation bobbed, viable à l'état hémizygote et présentant un phénotype bobbed bien net (les mâles bb/o ou les femelles bb/$bb^{déf}$* sont viables et phénotypiquement bb fort). Les mutations "bobbed extrême" induites par l'agent mutagène, seront repérables en face du bobbed utilisé comme testeur. Les mutations "bobbed léger", compensées par le locus bobbed placé en face, ne seront pas repérables.

Nous avons utilisé le chromosome yvbb pour sélectionner les bobbed sur le chromosome M-5 et le chromosome $B^{S}Ybb$ pour les sélectionner sur le chromosome X de la souche sauvage Oregon R. Rappelons que la mutation bobbed de la souche yvbb est viable chez les mâles yvbb/o et chez les femelles yvbb/$bb^{déf}$; la mutation $B^{S}Ybb$ est également viable chez les mâles $bb^{déf}/B^{S}Ybb$.

4) Mutagénèse.

L'éthyl méthane sulfonate (EMS) (Eastman Organic Chemical) est administré aux mouches selon la technique décrite par LEWIS et BACHER (1968).

Des mâles adultes de génotype +/Ybb^{+} ou M-5 ($B^{+}w^{a}$)/Ybb^{+} âgés de 0 à 48 heures sont nourris sur un "Kleenex" saturé avec une solution de saccharose 1 % contenant 0,025 M d'EMS.

Pour préparer 100 ml de cette solution, 0,24 ml d'EMS sont mis en suspension dans 100 ml d'une solution stérile de saccharose à 1 %. A l'aide d'une seringue, on peut par un mouvement de va et vient solubiliser l'EMS.

Environ 10 ml de cette solution sont versés dans une bouteille de culture vide contenant un "Kleenex" tassé au fond. 50 à 100 mâles sont mis dans chaque bouteille et sont nourris par la solution d'EMS. Au bout de 24 heures, les mâles incapables de résister à l'éther sont transférés sans

---

*$bb^{déf}$ = délétion complète du locus bb.

FIGURE 8 : Protocole expérimental permettant la mise en évidence des mutants "bobbed" sur le chromosome M -5 (B^+w^a).

- Croisement 1 : ♀ yvbb/yvbb X ♂ M -5(B^+w^a)/Y bb^+

(traités à l'EMS)

↓

♀ yvbb/M -5(B^+w^a)^t

♂ yvbb/Y bb^+

} F1 (bb^+)

Recherche des femelles présentant le phénotype bobbed.

- Croisement 2 : ♀ F1 présentant le phénotype bobbed X ♂ F1 yvbb/Y bb^+ (bb^+)

↓

♀ yvbb/yvbb
♀ yvbb/M -5(B^+w^a)^t
♂ yvbb/Y bb^+
♂ M -5(B^+w^a)^t/Y bb^+

} F2

- Croisement 3 : ♀ F2, yvbb/M -5(B^+w^a)^t (bb) X ♂ F2, M -5(B^+w^a)^t/Y bb^+ (bb^+)

↓

♀ M -5(B^+w^a)^t/M -5(B^+w^a)^t
♀ M -5(B^+w^a)^t/yvbb
♂ yvbb/Y bb^+
♂ M -5(B^+w^a)^t/Y bb^+

} F3

Viabilité du mutant à l'état homozygote

t = Chromosome traité.

FIGURE -9-: Protocole expérimental permettant la mise en évidence des mutants (bb) sur le chromosome X normal de la souche OREGON R.

- Croisement 1 : ♀ $\overline{XX}$, yvf/B^S Y bb × ♂ +/B^S Y bb^+ (traités à l'EMS)

  ↓

  ♀ $\overline{XX}$, yvf/B^S Y bb^+
  ♂ $+^t$/B^S Y bb
  } F1 (bb^+) Recherche des mâles présentant le phénotype bobbed.

- Croisement 2 : ♀ M -5(Bw^abb)/ClB (bb^+) × ♂ $+^t$/B^S Y bb (bb)

  ↓

  ♀ M -5(Bw^abb)/ $+^t$
  ♀ $+^t$/ClB
  ♂ M -5(Bw^abb)/B^S Y bb
  ♂ ClB/B^S Y bb
  } F2 (bb) létaux

- Croisement 3 : ♀ M -5(Bw^abb)/ $+^t$ × ♂ M -5($Bw^a$$bb^+$)/$B^S$ Y bb^+

  ↓

  ♀ M -5($Bw^a$$bb^+$)/$+^t$
  ♀ M -5($Bw^a$$bb^+$)/M -5($Bw^a$bb)
  ♂ $+^t$/B^S Y bb^+
  ♂ M -5(Bw^abb)/B^S Y bb^+
  } F3

- Croisement 4 : ♀ M -5($Bw^a$$bb^+$)/$+^t$ × ♂ $+^t$/B^S Y bb^+

  ↓

  ♀ $+^t$/$+^t$
  ♀ M -5($Bw^a$$bb^+$)/$+^t$
  ♂ $+^t$/B^S Y bb^+
  ♂ M -5($Bw^a$$bb^+$)/$B^S$ Y bb^+
  } F4 Viabilité du mutant à l'état homozygote

être endormis dans une bouteille de culture contenant du milieu nutritif standard et sont ensuite croisés avec des femelles vierges de génotype approprié.

5) Mise en évidence des mutations au locus bobbed.

Les croisements qui permettent la mise en évidence des mutations bobbed sont décrits dans les figures 8 et 9.

Dans la descendance F1 des croisements impliquant les mâles traités à l'EMS, l'apparition de femelles yvbb/M-5 t^* (protocole 1 -Fig. 8-)ou de mâles $+t^*/B^S$Ybb (protocole 2 -Fig. 9-) de phénotype bobbed peut être la conséquence non seulement d'une mutation au locus bobbed mais aussi de l'un des événements suivants :

- Mosaïques : Phénotype bobbed de mouches génotypiquement sauvages en ce qui concerne leur lignée germinale.

- Mutation dominante engendrant un phénotype analogue à bobbed.

- Mutation récessive liée au chromosome X donnant le même effet que bobbed (seulement possible dans le cas du protocole 2).

L'analyse génétique des mouches F1 phénotypiquement bobbed permet d'estimer l'importance relative de ces différents événements. On peut aisément faire la distinction entre les mosaïques et l'apparition de nouvelles mutations ; parmi celles-ci, le test de complémentation permet de reconnaître celles qui sont au niveau du locus bobbed.

Pour déterminer la nature de chaque événement particulier qui a conduit à l'apparition de mouches phénotypiquement bobbed, on croise dans le cas du protocole 1, les femelles F1 (bb?) par des mâles frères et dans le cas du protocole 2, les mâles (bb?) par des femelles de génotype M-5 (Bw^abb)/ClB (le chromosome M-5 porte une mutation bobbed et le chromosome partenaire porte un léthal et une inversion nous permettant de l'utiliser comme balanceur). Selon le cas, les résultats suivants sont attendus :

- Mosaïque : on ne retrouvera pas de mouches phénotypiquement bobbed dans la descendance de ces deux croisements (croisement n°2 des figures 8 et 9).

---

t^* = chromosome traité

- Mutation dominante liée aux autonomes : on observera son effet chez les mâles et les femelles (croisement 2).

- Mutation dominante liée au chromosome X :

Protocole 1 : la moitié des femelles et des mâles dans la descendance du croisement n°2 présenteront le phénotype correspondant.

Protocole 2 : toutes les femelles de la descendance du croisement n° 2 présenteront un phénotype muté.

- Mutation récessive liée au chromosome X : possible dans le cas du protocole 2, on ne retrouvera pas de phénotype bobbed parmi les femelles M-5 (Bw^abb)/$+^t$ provenant du croisement 2.

- Mutation au locus bobbed : dans le cas du protocole 1 on observera à la F2 des femelles yvbb/M-5 $(B^+w^a)^t$ phénotypiquement bobbed et des mâles M-5 $(B^+w^a)^t/Y^{bb^+}$ (bb^+). Dans le cas du protocole 2, dans la descendance du croisement n°2 on retrouvera une différence phénotypique entre les femelles M-5 (Bw^abb)/$+^t$ [bb] et les femelles ClB/$+^t$ [bb^+].

C - RESULTATS DE LA MUTAGENESE (tableaux 3,4,5,6).

Les tableaux 3 et 4 rassemblent les résultats obtenus dans deux expériences indépendantes faites dans des conditions identiques en traitant des mâles M-5/Ybb^+.

Le résultat du traitement mutagène des mâles +/Ybb^+ est consigné dans les tableaux 5 et 6.

Bien qu'il s'agisse de résultats obtenus en traitant deux types de mâles, on peut néanmoins tirer les renseignements suivants :

En ce qui concerne l'efficacité de l'EMS, on constate (tableau n° 5) une mortalité des mâles F1 ($+^t/B^SY^{bb}$) par rapport aux femelles soeurs atteignant 0,50. Dans l'expérience témoin, ce rapport est normal (1,02). Cette forte mortalité est liée aux mutations léthales induites sur le chromosome X. Dans le cas où la sélection se fait chez les femelles, on ne peut pas évaluer l'efficacité de l'EMS de la même façon. Le rapport mâles/femelles - 1,08 - est légèrement supérieur à celui obtenu dans l'expérience témoin - 1,02 - indiquant qu'il peut y avoir 5 % de mutations

TABLEAU -3 -

EXAMEN DE LA DESCENDANCE DES MALES TRAITES M -5(B^+w^a)^t/Y bb^+

CROISES PAR DES FEMELLES yvbb/yvbb

	♀ M -5(B^+w^a)^t/yvbb (bb^+)	♂ yvbb/Y bb^+ (bb^+)	Phénotypes nouveaux		"Sexe ratio" mâles/femelles
			♀ M -5(B^+w^a)^t/yvbb (bb)*	♀ M -5(B^+w^a)^t/yvbb (bb^+y)	
Expérience I	20 503	22 231	118	5	1,08
Témoin I	3 297	3 361	5	0	1,02
Expérience II[a]	27 979	-	153	22	-
Temoin II[a]	3 106	-	6	-	-

* (bb) = Tout phénotype type poils courts et fins ou abdomen déformé.

a = Expérience faite par N. PRUD'HOMME en utilisant la même dose d'EMS sur des mâles M-5(Bw^a)/Ybb^+.

TABLEAU - 4 -

ANALYSE DES PHENOTYPES NOUVEAUX APPARUS CHEZ LES FEMELLES F1

M -5 $(B^+w^a)^t$/yvbb PROVENANT DU CROISEMENT ♂ M -5 $(B^+w^a)^t$/Y bb^+ x ♀ yvbb/yvbb

	Nombre de ♀ analysées	Répartition des femelles phénotypiquement bobbed								Répartition des ♀ (y)			
		♀ stériles	Mosaïques	Mosaïques avec lethal sur X	Mutation dominante	Mutation autosomale dominante + lethal sur X	Mutation lethale sur X	bb	bb + lethal sur X	♀ analysées	Mosaïques y	y	y et lethal sur X
(Expérience I	118	30/22 *	43/18	4/2	19/11	11/8	8/5	2/2	1	5	0	2	3
(Témoin I	5	0	5/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Expérience [a]II	153	-	-	-	19	7	5	2	0	22	-	-	-
(Témoin [a]II	6	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0

a = Expérience faite par N. PRUD'HOMME.

* = Nombre de ♀ étudiées/nombre de bouteilles où les femelles ont été trouvées.

TABLEAU - 5 -

EXAMEN DE LA DESCENDANCE DES MALES TRAITES +/Y bb^+

CROISES A DES FEMELLES $\overline{XX}$,yvf/B^s Y bb

	♀ $\overline{XX}$/Y bb^+ (yvf)	♂ $+^t/B^s$ Y bb (B)	Phénotypes nouveaux			"Sex ratio" ♂/♀
			♂ $+^t/B^s$ Y bb (B bb)	♂ $+^t/B^s$ Y bb (Bf)	♂ $+^t/B^s$ Y bb (Bv)	
Expérience	14 781	7 371	63	2	1	0,5
Témoin	4 084	4 166	5	1	0	1,02

TABLEAU -6-

ANALYSE DES PHENOTYPES INDUITS CHEZ LES MALES $+^t/B^s$ Y bb

PROVENANT DU CROISEMENT ♂ $+^t/Y$ bb^+ x ♀ XX, yvf/B^s Y bb

	Répartition des mâles phénotypiquement bobbed						Répartition des mâles f et v					
							"forked" = f			vermillon = v		
	Nombre de ♂ analysés	Mâles stériles	Mosaïques	Mutations recessives liées à l'X	Mutations dominantes liées aux Autosomes	Mutations bb	Nombre testés	Mosaïques	f	Nombre testés	Mosaïques	v
Expérience	63	15/10 *	25/10	6/6	15/10	2/2	2	0	2	1	0	1
Témoin	5	0	5/4	0	0	0	1	1	0	0	0	0

* = Nombre de mâles étudiés/nombre de bouteilles où les mâles ont été trouvés.

léthales dominantes induites par l'EMS. D'autre part le tableau n°4 montre une forte proportion de double mutations par rapport aux simples mutations (3 y liés à un léthal sur le chromosome X sur 5 y analysés ; 1 bobbed lié à un léthal sur 3 bobbed obtenus ; 8 mutations autosomales dominantes liées à un léthal sur le chromosome X sur 19 mutations autosomales indépendantes) indiquant une action puissante de l'EMS. Dans l'expérience témoin, aucune mutation visible n'a été détectée. La dose d'agent mutagène, utilisée, est très forte et dans un système de sélection chez les mâles (tableaux 5 et 6) on perd en moyenne 50 % des chromosomes X traités pouvant contenir en plus de la (ou des) mutations léthales d'autres mutations non léthales.

Chez les drosophiles mâles, l'EMS a une action post-méiotique (JENKINS 1967) et une forte proportion des mutations induites par cet agent mutagène sont mosaïques ; les résultats des tableaux 4 et 6 confirment cette observation.

En ce qui concerne la proportion relative des mutations bobbed et de certaines mutations visibles récessives pouvant être criblées en même temps, on constate (tableau 4) que la proportion des mutations y est au moins aussi importante. Le tableau -6- montre, en outre, que l'agent mutagène EMS induit avec autant d'efficacité des mutations bobbed, forked, et vermilion. Ces résultats semblent montrer que l'EMS n'a pas d'action spécifique sur certains loci, mais les données ne permettent pas de savoir si cette action est également efficace à tous les loci. On constate cependant que cet agent mutagène induit avec autant d'efficacité des mutations au niveau de l'hétérochromatine (locus bobbed) qu'au niveau de l'euchromatine. WILLIAMSON (1970) montre que l'EMS induit des mutations au niveau du chromosome sexuel Y et plusieurs mutants (mâles stériles) ont ainsi été sélectionnés.

L'action de l'EMS sur des gênes redondants est probable ; en effet en dehors des mutations obtenues au niveau du locus bobbed, les résultats (tableaux 2 et 4) montrent une proportion appréciable de mutations dominantes sur le chromosome X et les autosomes. Ces mutations présentent toutes les caractéristiques des mutations "Minute" (poils courts et fins à l'état hétérozygote, lethalité à l'état homozygote) et certaines d'entre elles se localisent au même endroit ou tout près de certains mutants "Minute" connus dans la littérature (N. PRUD'HOMME, Communication personnelle). Les différents ARN de transfert sont gouvernés par des gènes répétés environ une quinzaine de fois (RITOSSA et coll. 1965) et les gènes "Minute" pourraient correspondre à ces gènes (STEFFENSEN et WIMBER 1970 et GRIGLIATTI et coll. 1974).

D- ANNEXE

1) Nomenclature utilisée :

Les différents mutants bobbed isolés dans ces expériences ont reçu la nomenclature suivante :

- Mutations bb isolées sur le chromosome Basc = M-5 (Bw^a) :

bb^{P1} et bb^{P2}

- Mutations bb isolées sur le chromosome asc = M-5 (B^+w^a)

bb^{P3} - bb^{P4} et bb^{P8}

- Mutations bb sélectionnées sur le chromosome X de la souche Oregon :

bb^{P5} et bb^{P6}

(La lettre P signifie Paris)

2) Construction des souches :

Les mutations sont conservées en souche soit chez les mâles en utilisant des femelles à X attachés ($\overline{XX}$), soit chez les femelles et les mâles en se servant d'un chromosome X balanceur.

En ce qui concerne les X attachés, on a utilisé des X marqués par les mutations récessives y, v, f ; le chromosome Y porte une translocation de l'X marquée par la mutation Bar :

♀ $\overline{XX}$: yvf/B^SYbb^+ X ♂ M-5$(bb^P)/B^SYbb^+$ ou ♂ bb^P/B^SYbb^+ (mutation bb sur X normal)

En ce qui concerne les balanceurs du chromosome M-5, les inversions ClB ou In Am sont couramment utilisées. L'inversion ClB porte un léthal récessif et l'inversion Am confère une stérilité femelle lorsqu'elle est à l'état homozygote. Comme on le verra ultérieurement, ce moyen de conserver en souche les mutations bobbed n'a été utilisé que pour les bobbed qui se sont avérés léthaux ou subléthaux à l'état homozygote. En effet pour

un bobbed P donné on peut avoir les deux possibilités présentées dans la figure suivante :

a) Utilisation du balanceur ClB = $In(1)C_1$, Scl(1)C t^2 Sl B =

G0 ♀ M-5(bb^P)/ClB X ♂M-5(bb^P)/$B^S Ybb^+$

G1 ♀ M-5(bb^P)/M-5(bb^P) ; ♀ M-5(bb^P)/ClB ; ♂ M-5(bb^P)/$B^S Ybb^+$; ♂ ClB/$B^S Ybb^+$

léthales ou sub-léthales — identiques aux ♀ G0 — identiques aux ♂ G0 — léthaux

G2 ♀ et ♂ identiques à G1

Dans le cas où M-5(bb^P)/M-5(bb^P) est bien viable et fertile il est préférable d'utiliser le système X attachés pour éviter une réversion vers bb^+ à la suite de "crossing over" inégaux au niveau du locus bobbed.

b) Utilisation du balanceur In Am : In(1) 8 C17 - D1 ; 16 E2-3

G0 ♀ M-5(bb^P)In Am X ♂ M-5(bb^P)/$B^S Ybb^+$ ou ♂ In Am/$B^S Ybb^+$

G1 ♀ M-5(bb^P) / M-5(bb^P) ; M-5(bb^P) / InAm ; ♂ M-5(bb^P)/$B^S Ybb^+$; ♂ InAm/$B^S Ybb^+$

léthales ou sub-léthales — ♀ identiques aux ♀ G0 — ♂ identiques aux ♂ G0 — ♂ identiques aux ♂ G0

Si la fécondation des ♀ se fait par les ♂ In Am/$B^S Ybb^+$ on obtient :

♀ M-5(bb^P)/In Am ; ♀ In Am/In Am ; ♂ M-5(bb^P)/$B^S Ybb^+$ et ♂ InAm/$B^S Ybb^+$

♀ identiques à G0 — ♀ stériles — ♂ identiques à G0 — ♂ identiques à G0

G2 identiques à G1

Pour les mêmes raisons que dans a) ce système n'est utilisé que pour les mutations bobbed léthales ou subléthales.

CHAPITRE II : CARACTERISTIQUES GENETIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES MUTANTS BOBBED SELECTIONNES.

Les études que j'expose dans ce chapitre concernent essentiellement la localisation génétique, les effets de dosage et la détermination des stades de léthalité. Les mutants utilisés dans ce travail sont ceux induits sur le chromosome M-5 : bb^{P1}, bb^{P2}, bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8}.

Le mutant bb^{P5} induit sur le chromosome X normal a été étudié par Daniel LOCKER (1973).

1) Localisation génétique.

Les mutations bobbed (bb^{P1}, bb^{P2}, bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8}) induites à l'EMS sur le chromosome M-5 ont été localisées par rapport aux marqueurs y (yellow) et B (Bar) encadrant la région bobbed. Ce travail permettait aussi de voir si l'agent mutagène n'avait pas provoqué un remaniement chromosomique (déficience ou inversion) détectable.

Les mutations bb^{P1} et bb^{P2} ont été induites sur le chromosome M-5 (Basc) qui porte les marqueurs B et w^a (white apricot), les mutations bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8} sur le chromosome M-5 (asc) portant B^+ et w^a. D'autre part, nous avons conservé en souche un chromosome asc portant une mutation y qui avait été obtenue dans l'expérience de mutagénèse. Nous avons introduit par recombinaison ce gène muté sur le chromosome Basc

♀ M-5 $(y^+ bb^{P1} B)$/M-5 $(ybb^+ B^+)$ x ♂ yvbb/Ybb^+ ou
♂ M-5 $(ybb^+ B^+)$/Ybb^-

♀ M-5 $(y^+ bb^{P3} B^+)$/M-5 $(ybb^+ B)$ X ♂ yvbb/Ybb^+ ou
♂ M-5 $(ybb^+ B^+)$/Ybb^-

Dans d'autres expériences nous avons utilisé des croisements nous permettant de voir un seul type de recombinés dans une même descendance.

L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau (7) :

Le pourcentage de recombinaison entre y et les différents mutants bobbed est inférieur à 0,05 %, ce qui est en accord avec la faible distance séparant y du locus bobbed sur l'inversion M-5. Cependant pour les mutants bb^{P1} et bb^{P8} on n'a pas observé de recombinés y-bb. La distance séparant y de bobbed étant très faible, 0 % de recombinaison déterminé sur 8599 mouches (bb^{P1}) ou sur 2754 mouches (bb^{P8}) n'est pas significativement différent des pourcentages obtenus pour les autres bobbed.

Le pourcentage de recombinaison entre bb et B n'est pas significativement différent pour les mutations bb^{P2}, bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8}. Le mutant bb^{P1} présente cependant un pourcentage de recombinés plus faible. Notons qu'aucun recombiné y-bb^{P1} n'a été observé. L'hypothèse d'un petit accident chromosomique produit par l'agent mutagène pourrait rendre compte de cette faible différence observée au niveau de bb^{P1}. Cependant, l'observation des chromosomes des glandes salivaires n'a pas montré de remaniements chromosomiques cytologiquement visibles (N. PRUD'HOMME, Communication personnelle).

2) Effet de dosage.

Le tableau -8- rassemble les résultats obtenus en combinant entre elles les différentes mutations sélectionnées ici, ainsi qu'avec d'autres mutations connues pour être déficientes en ADNr. Les mutations yvbb et Sc^{4L} Sc^{8R}, No^{-} ont respectivement 0,069 % et 0 % d'ADNr ; la mutation Ybb^{-} se comporte comme une déficience totale de la région bobbed ; le pourcentage d'ADNr correspondant, mesuré par différents chercheurs varie de 0 % (SPEAR, 1974) à 0,086 % (RITOSSA 1968), alors que nos estimations (Partie III de cette thèse) sont en accord avec le fait que le chromosome Ybb^{-} contient au maximum 0,017 % d'ADNr.

Ce tableau montre :

- En face d'une délétion complète en ADNr (Sc^{4L} Sc^{8R},No^{-}), les mutations bb^{P1}, bb^{P2}, bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8} sont léthales ; elles sont également léthales chez les mâles en face de Ybb^{-}.

TABLEAU - 7 -

Localisation de bb par rapport à y et B

Mutant bb	Nombre de recombinés y-bb	Mouches comptées	% de recombinaison y-bb	Nombre de recombinés bb-B	Mouches comptées	% de recombinaison bb-B
bb^{P1}	0	8599	0,00	1168	9889	11,81 ± 0,64
bb^{P2}	4	13546	0,029	1103	8072	13,66 ± 0,76
bb^{P3}	2	10871	0,018	1217	8358	14,56 ± 0,78
bb^{P4}	1	13802	0,0072	854	5868	14,55 ± 0,92
bb^{P8}	0	2754	0,00	508	3428	14,8 ± 1,22

Témoin utilisé : Distance y - B sur M-5

Croisement M-5 $(y^+bb^+B)/M\text{-}5\ (ybb^+B^+) \times \sigma^{\prime}$ M-5 $(ybb^+B^+)/Ybb^+$

Mouches comptées	Nombre de recombinés y - B	% de recombinaison
3721	517	13,89 ± 1,14

TABLEAU - 8 - : Phénotype des différents mutants bb (EMS) associés entre eux et avec d'autres mutants bb connus.

Mutation bb	bb^{P1}	bb^{P2}	bb^{P3}	bb^{P4}	bb^{P8}	yvbb	Sc^{4L} Sc^{8R} délétion complète de bb	$YB^{S}bb$	Ybb^{-}
bb^{P1}	léthale	léthale	léthale	léthale	léthale	viable bb fort	léthale	très peu viable bb très fort	léthale
bb^{P2}		subléthale	léthale	léthale	léthale	viable bb fort	léthale	viable bb fort	léthale
bb^{P3}			léthale	léthale	léthale	viable bb très fort	léthale	viable bb très fort	léthale
bb^{P4}				léthale	léthale	viable bb très fort	léthale	viable bb très fort	léthale
bb^{P8}					léthale	viable bb très fort	léthale	viable très fort	léthale
yvbb						bb léger bonne viabilité	bb très fort	bb léger bonne viabilité	bb très fort
Sc^{4L} Sc^{8R}							léthale	viable bb très fort	
$B^{S}Y$ bb									
Ybb^{-}									

- bb léger : poils courts et fins sans déformation de l'abdomen
- bb fort : poils courts et fins, abdomen très déformé
- bb très fort : poils courts et fins, abdomen très déformé, viabilité très réduite ne dépassant pas 10 %
- bb subléthale : limite de la viabilité (5 %), abdomen très déformé.

- T A B L E A U -9-

Viabilité des mutants bb induits à l'EMS, déterminée chez des mâles $bb/B^{S}Ybb$.

Génotype des mâles	Pourcentage de viabilité
$bb^{P1}/B^{S}Ybb$	3 %
$bb^{P2}/B^{S}Ybb$	34 %
$\frac{Sc^{4L}\ Sc^{8R}\ No^{-}}{B^{S}Ybb}$	8 %
$bb^{+}/B^{S}Ybb$	100 %

- A l'état homozygote, à l'exception de bb^{P2}, subléthale (environ 5 % des femelles bb^{P2}/bb^{P2} arrivent à terme), les autres mutations sont toutes léthales. Les femelles bb^{P2}/bb^{P2} qui arrivent au stade imago présentent un phénotype bobbed extrême, c'est à dire un abdomen très déformé, un développement larvaire retardé de 4 à 5 jours ; en outre, elles sont stériles.

- Combinés entre eux, les différents mutants ne complémentent pas pour conduire à des femelles hétérozygotes viables.

- Combinés avec yvbb chez les femelles ou avec $B^{S}Ybb$ chez les mâles, les mutants bb^{P3}, bb^{P4} et bbP^{8} conduisent à des mouches dont le phénotype ne diffère pas de celui obtenu en combinant $Sc^{4L}Sc^{8L}$,No^{-} avec yvbb ou $B^{S}Ybb$.

En nous basant sur les phénotypes, nous pouvons conclure que ces différentes mutations (bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8}) ont un effet additif nul ou très faible et que les mutations bb^{P1} et bb^{P2} ont un léger effet additif.

Le tableau -9- indique la viabilité des mâles $bb^{P1}/B^{S}Ybb$ et $bb^{P2}/B^{S}Ybb$, il est clair que la mutation bb^{P2} a un effet additif en face de $B^{S}Ybb$ par contre bb^{P1} semble moins viable que le témoin. Cette moins bonne viabilité est à l'appui de l'hypothèse selon laquelle un petit accident chromosomique se serait produit dans la région proche de bobbed.

3) Détermination des stades de léthalité.

Il est intéressant de déterminer les stades de léthalité pour deux raisons au moins :

- Il permet un classement des mutants.

- Il nous permet de savoir s'il est possible d'étudier l'homozygote avant sa mort.

Cette étude a porté sur la majorité des combinaisons léthales présentées dans le tableau -8-. Elle a nécessité la mise au point d'un système permettant de suivre l'évolution des larves depuis l'éclosion jusqu'à la pupaison (technique détaillée dans le Chapitre Matériels et Méthodes).

TABLEAU -10-

Estimation du stade de léthalité de l'homozygote : In (1) $Sc^{4L}Sc^{8R}$, $ySc^{4}Sc^{8}$ No^{-}/In (1)$Sc^{4L}Sc^{8R}$, $ySc^{4}Sc^{8}$ No^{-}) testé dans la descendance des ♀ In(1)$Sc^{4L}Sc^{8R}$,No^{-}/+ × ♂ +/Ybb^{+} et ♂ In(1)Sc^{4L} Sc^{8R},No^{-}/Ybb^{+} .

♀ / ♂	In (1) Sc^{4L} Sc^{8R}, No^{-}/+					
	oeufs pondus	oeufs morts	léthalité embryonnaire	larves	larves mortes	léthalité larvaire
+/Ybb^{+}	684	68	10 %	616	9	1,3 %
In(1)$Sc^{4L}Sc^{8R}$,No^{-} / Ybb^{+}	879	201	22,9 %	678	113	12,8 %
$Sc^{4L}Sc^{8R}No^{-}$ / $Sc^{4L}Sc^{8R}No^{-}$ (a)	-	-	* 12,9 %	-	-	11,5 %

(a) Léthalité dûe à la présence de 1/4 d'individus de génotype Sc^{4L} $Sc^{8R}No^{-}$/Sc^{4L} $Sc^{8R}No^{-}$

* Léthalité calculée en tenant compte du témoin (ligne 1)

TABLEAU -11-

Léthalité déterminée aux stades embryonnaires et larvaires consécutive aux mutations bb induites par l'EMS dans la descendance de différents croisements.

♂ \ ♀	M-5(Bbb$^+$)/M-5(Bbb$^+$)		M-5(Bbb$^+$)/M-5(Bbb^{P2})		M-5(Bbb$^+$)/M-5(B$^+$bb^{P3})		M-5(Bbb$^+$)/M-5(B$^+$bb^{P4})		M-5(Bbb$^+$/M-5(B$^+$bb^{P8}	
	% d'oeufs morts	% de larves mortes	% d'oeufs morts	% de larves mortes	% d'oeufs morts	% de larves mortes	% d'oeufs morts	% de larves mortes	% d'oeufs morts	% de larve mortes
♂M-5(Bbb$^+$/B^{S}Ybb$^+$	3,8	2,7	4,7	4,3	7,8	3,6	8	2,5	2,7	5,2
♂M-5(Bbb^{P2})/B^{S}Ybb$^+$	4	5,5	6,8	15*	6,1	26,3	5,1	-	4,6	27,1
♂M-5(B$^+$bb^{P3})/B^{S}Ybb$^+$	6	1,1	6,3	28,5	7,8	27,1	7,2	30	9,5	28,8
♂M-5(B$^+$bb^{P4})/B^{S}Ybb$^+$	6,2	4,9	-	-	7,6	30,1	8,5	29	12,4	32,5
♂M-5(B$^+$bb^{P8})/B^{S}Ybb$^+$	3,3	3,4	7,5	26,6	9,2	24,5	8,2	32,4	12,8	28,2
♂W^{Sn}/Ybb$^-$	9,7	2,5	12,5	23,6	17,4	23,5	18	27,5	20,7	22,1

*Pour bb^{P2} homozygote il y a une mortalité pupale de l'ordre de 7,7 % et environ 5 % arrivent au stade Imago

Les résultats de cette étude sont présentés dans les tableaux -10- et -11- :

- Le nombre de morts attendus dans la descendance du croisement ♀ $Sc^{4L}Sc^{8R}$ No^{-}/bb^{+} X ♂ $Sc^{4L}Sc^{8R}$ No^{-}/Ybb^{+} étant de 25 %, nous obtenons un chiffre très voisin - 24,4 %- Cette mortalité se répartissant de façon équivalente entre les stades embryonnaires -12,9%- et larvaires -11,5%- (Tableau 10). La léthalité larvaire survient 2 à 3 heures après l'éclosion. L'observation des oeufs qui n'arrivent pas à terme montre que ces derniers arrêtent leur développement à un stade très avancé de l'embryogénèse ; dans la majorité de ces oeufs on peut remarquer la segmentation de la larve. Ce résultat est en accord avec le fait que chez les mutants bobbed classiques (déficients en ADNr), le temps séparant la ponte de l'éclosion est identique à celui de la souche sauvage de référence (bb^{+}), témoigne de l'importance des substances maternelles destinées à permettre à l'oeuf, une fois fécondé, de se différencier complétement et d'atteindre le premier stade larvaire. L'effet d'une mutation bobbed ne se manifeste qu'à partir des stades larvaires. Chez *Xenopus laevis*, il existe des mutants dépourvus de nucléoles (ESPER et coll. 1964). Les individus homozygotes totalement dépourvus d'organisateurs nucléolaires sont bien entendu, incapables de synthétiser les ARNr 28S et 18S ; ces individus anucléolés (No^{-}) ne meurent qu'à un stade relativement avancé du développement au moment où le jeune têtard commence à se nourrir. Pour un même type de mutation, nous retrouvons des effets analogues chez la Drosophile.

- En ce qui concerne les pourcentages de mortalité au cours du développement embryonnaire et larvaire des mutants bobbed induits sur le chromosome M-5 combinés entre eux ou avec la mutation Ybb^{-}, le tableau -11- apporte les renseignements suivants :

Au cours de l'embryogénèse, le pourcentage de mortalité n'est pas différent de celui obtenu chez le témoin (Ligne 1 du tableau -11-), à l'exception des combinaisons avec Ybb^{-} et de certains croisements impliquant bb^{P8}. Dans le témoin et dans les croisements où le pourcentage d'oeufs morts est faible, l'observation de ces oeufs morts montre que dans la plupart des cas ils ne subissent pas de développement et on a toutes les raisons de croire qu'ils ne sont pas fécondés. Dans le croisement

♀ bb^{+}/bb^{P8} X ♂ $bb^{P8}/B^{S}Ybb^{+}$, les oeufs qui ne donnent pas de larves, meurent peu de temps avant l'éclosion larvaire ; comme dans le cas de l'homozygote : $Sc^{4L}Sc^{8R}$ $No^{-}/Sc^{4L}Sc^{8R}$ No^{-} (tableau -10-) on y voit la segmentation de la larve.

Enfin, les croisements impliquant Ybb^{-} présentent un pourcentage d'oeufs morts élevé, notamment avec bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8}, et à un degré moindre avec bb^{P2} et bb^{+} ; l'observation des oeufs morts montre que le développement s'est arrêté à un stade avancé de l'embryogénèse.

Au cours du développement larvaire, les mutants bobbed léthaux (bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8}) meurent (à l'état homozygote ou chez les mâles bb^{P}/Ybb^{-}) au premier stade larvaire. La léthalité survient 3 à 10 heures après l'éclosion pour bb^{P3} et bb^{P8} et 20 à 40 heures pour bb^{P4}. Rappelons que l'homozygote $Sc^{4L}Sc^{8R}$ $No^{-}/Sc^{4L}Sc^{8R}$ No^{-} meurt au plus tard 3 heures après l'éclosion, donc ces mutants survivent un peu plus, soit au maximum 7 heures pour bb^{P3} et bb^{P8} et 33 heures pour bb^{P4}.

Les individus de génotype bb^{P3}/bb^{P8}, bb^{P3}/bb^{P4} et bb^{P4}/bb^{P8} meurent dans la majorité des cas au cours des 20 premières heures et au plus tard 40 heures après l'éclosion.

En ce qui concerne la mutation bb^{P2}, subléthale à l'état homozygote, la léthalité touche tous les stades larvaires et le stade pupe ; à ce stade un certain nombre d'homozygotes bb^{P2}/bb^{P2} meurent juste au moment où l'imago quitte l'enveloppe pupale. Les individus de génotype bb^{P2}/bb^{P3}, bb^{P2}/bb^{P4}, bb^{P2}/bb^{P8} et bb^{P2}/Ybb^{-} meurent généralement au début du 3ème stade larvaire. Certaines larves restent avant de mourir, 3 à 4 jours sans évoluer.

En conclusion, l'observation des stades de léthalité au cours du développement permet de classer les mutants bobbed les uns par rapport aux autres : par rapport à l'homozygote $Sc^{4L}Sc^{8R}$ $No^{-}/Sc^{4L}Sc^{8R}$ No^{-} qui meurt soit dans l'oeuf soit après l'éclosion (0 à 3 heures) nous avons successivement une survie larvaire de 3 à 10 heures pour bb^{P3} et bb^{P8} et 20 à 40 heures pour bb^{P4}, quant à la mutation bb^{P2} elle est subléthale.

4) Essai de réversion.

Deux moyens ont été utilisés pour induire la réversion de certaines mutations bobbed induites à l'EMS sur le chromosome M-5.

a) Réversion par l'EMS

Des mâles M-5 (bb^{P2})/$B^{S}Ybb^{+}$ et M-5 (bb^{P3})/$B^{S}Ybb^{+}$ traités par l'EMS sont croisés avec des femelles $\overline{XX}$, yvf/Ybb^{-}. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau -12- : aucune réversion au locus bobbed n'a pu être sélectionnée. En effet dans les deux cas, les mâles [Bw^{a}] apparus ont pour origine une non disjonction chez le mâle parental et non une réversion.

b) Réversion par "magnification"

La "magnification" décrite par RITOSSA (1968a) est un mécanisme permettant la réversion à haute fréquence des mutants bobbed qui s'observe dans la descendance de mâles phénotypiquement bobbed fort. La réversion intéresse aussi bien des mutations bobbed sur l'X que sur l'Y (BONCINELLI et coll. 1972). Un travail de même type a été réalisé avec les mutations bb^{P2}, bb^{P3} et bb^{P8}. Avec ces trois mutations nous avons étudié la "magnification" chez les mâles $bb^{P}/B^{S}Ybb$ (Protocole 1, figure -10-) et $bb^{P}/B^{S}Ybb/Ybb^{-}$ (Protocole n° 2, figure -10-). La réversion des mutants bobbed de l'X a été particulièrement observée dans la descendance de mâles bb/Ybb^{-} (RITOSSA, 1968a ; LOCKER et PRUD'HOMME 1973 et TARTOF 1973). On pourrait penser que le chromosome Ybb^{-} intervient dans le mécanisme de "magnification" ou du moins amplifie ce phénomène. Pour cette raison, nous avons utilisé dans le protocole n°2, les mâles bb possédant ce chromosome.

Dans les trois cas étudiés (bb^{P2}, bb^{P3} et bb^{P8}), les résultats obtenus montrent que ces mutations ne réversent même pas partiellement, dans des conditions où les mutations décrites par RITOSSA (1972) et LOCKER (1973) réversent à haute fréquence.

Enfin, il est important de rappeler, que toutes les mutations induites par l'EMS sur le chromosome M-5, sont conservées au laboratoire depuis plusieurs années sans réverser spontanément.

En résumé, les mutations bobbed léthales ou subléthales sélectionnées au cours de ce travail présentent les caractéristiques suivantes :

- Génétiquement, elles se localisent toutes au locus bobbed ; en raison de l'inversion M-5, elles sont très près de "yellow".

T A B L E A U -12-

Réversion des mutations bb^{P2} et bb^{P3} après mutagénèse à l'EMS

♂ traités à l'EMS	P ♀ $\overline{XX}$, yvf/Ybb⁻			
	♀F_1[yvfB]	♂ F1[$Bw^a bb^+$]	Origine des mâles $Bw^a bb^+$	
			Non disjonction	Réversion
♂ M-5(bb^{P2})/$B^S Ybb^+$	32 867	48	48	0
♂ M-5(bb^{P3})/$B^S Ybb^+$	17 554	21	21	0

Figure -10- : Protocoles expérimentaux utilisés pour l'étude de la "magnification" des bobbed léthaux.

Protocole n° 1 : Essai de "magnification" chez les mâles bb^P/B^SYbb

G1 ♀ $\overline{XX}$, yvf/B^SYbb X ♂ $M\text{-}5(bb^P)/B^SYbb$

↓

G2 ♀ $\overline{XX}$, yvf/B^SYbb et ♂ $M\text{-}5(bb^P)/B^SYbb$

Comparaison phénotypique des mâles G2 entre eux et par rapport aux mâles G1.

Protocole n°2 : Essai de "magnification" chez les mâles $bb^P/B^SYbb/Ybb^-$

♀ $M\text{-}5(B^+bb^P)/ClB$ X ♂ $M\text{-}5(B^+bb^P)/B^SYbb$

[B/2 bb^+] [B bb]

↓

(a) ♀ $M\text{-}5\ (B^+bb^P)/M\text{-}5(B^+bb^P)/B^SYbb$ X ♂ WSn/Ybb^-

[B bb]

↓

(b) G1 ♀ $\overline{XX}$, yvf/Ybb^- X ♂ $M\text{-}5\ (B^+bb)/B^SYbb/Ybb^-$

[B bb]

↓

G2 On regarde si dans ces descendances apparaissent des mâles $M\text{-}5(B^+bb^P)/Ybb^-$ ou $M\text{-}5(B^+bb^P)Ybb^-/Ybb^-$ viables.

(a) femelles exceptionnelles apparues à la suite de non disjonction chez le mâle parental.

(b) on croise individuellement les mâles G1 avec des femelles $\overline{XX}/Ybb^-$

- A l'état homozygote, ces mutations bobbed léthales (bb^{P3}, bb^{P4} et bb^{P8}) provoquent toutes la mort au premier stade larvaire. La survie est un peu plus longue pour bb^{P4} que pour bb^{P3} et bb^{P8}. De plus, pour bb^{P8}, la léthalité se manifeste déjà en partie dans l'embryon (la mutation bb^{P1} n'a pas été étudiée).

- Les mutations bobbed léthales ne complémentent ni entre elles, ni avec les bobbed classiques (déficients partiellement en ADNr).

- La mutation bb^{P2} subléthale, a un effet additif avec les bobbed classiques, mais ne complémente pas avec eux. Elle se comporte comme une mutation léthale en association avec les bobbed léthaux. La mortalité des individus hétérozygotes bb^{P2}/bb^{P} survient avant la pupaison. L'homozygote bb^{P2}/bb^{P2} meurt à tous les stades larvaires et même au stade pupe.

- On n'observe pas de réversion, sous l'action de l'EMS, des deux mutations bb^{P2} et bb^{P3} ; il est possible que le nombre de chromosomes analysés ne soit pas suffisamment important ; il est cependant proche de celui qui a permis la sélection des mutations bobbed. L'efficacité de l'EMS pour induire des réversions au site initialement muté serait faible ou nulle ; on n'observe pas, non plus de mutations dans des gènes suppresseurs.

L'ensemble des études physiologiques suggère que la plupart des mutations induites sur le chromosome M-5 pourraient s'expliquer soit par une déficience presque complète de l'ADNr, soit par la présence d'ADNr fonctionnellement inactif. La détermination du nombre de séquences codant pour les ARNr 28S et 18S permettra de trancher entre les deux hypothèses.

CHAPITRE III : DETERMINATION DU NOMBRE DE GENES CODANT POUR LES ARNr 28S ET 18S CHEZ LES MUTANTS BOBBED SELECTIONNES : HYBRIDATION MOLECULAIRE DE L'ADN TOTAL EXTRAIT DES MUTANTS AVEC LES ARNr EXTRAITS DE LA SOUCHE SAUVAGE bb^+ (MARRAKECHI et PRUD'HOMME 1970).

1) Matériel biologique et techniques utilisés

a - Sources d'ADN

L'ADN est obtenu à partir des génotypes suivants :

- ♀ In Am/In Am
- ♀ M-5(Bbb^{P1})/In Am
- ♀ M-5(Bbb^{P2})/In Am
- ♀ M-5(B^+bb^{P3})/In Am
- ♀ M-5(B^+bb^{P4})/In Am
- ♀ M-5(Bbb^{P2})/M-5(Bbb^{P2})
- ♂ In(1) $Sc^{4L}Sc^{8R}$ No^-/B^SYbb^+
- ♂ M-5(B^+bb^+)/B^SYbb^+
- ♂ M-5(Bbb^{P2})/B^SYbb^+
- ♂ bb^{P5}/B^SYbb^+
- ♂ bb^{P6}/B^SYbb^+
- ♂ M-5(Bbb^{P8})/B^SYbb^+

5 à 10 grammes de mouches, correspondant à chacun des génotypes, ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN. Nous obtenons en général 2 à 3 mgrs d'ADN à partir de ces 10 grs de mouches.

b - Purification de l'ADN

La purification de l'ADN de Drosophile par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite est représentée par la figure -11-. Le profil obtenu, montre une bonne purification de l'ADN qui est élué à environ 0,26 - 0,27 M phosphate. L'ADN est récupéré en une seule fraction, concentré et utilisé dans les expériences d'hybridation.

c - Source d'ARN ribosomal

Les ARNr 28S et 18S marqués à l'uridine-5-^{3}H, sont obtenus à partir des larves sauvages. La radioactivité spécifique de ces ARNr mesurée dans un compteur à scintillation (Nuclear Chicago Scintillation Spectrometer, rendement 15 à 20 %) est d'environ 30 000 (cpm par µ gr d'ARN.

d - Purification de l'ARN ribosomal 28S et 18S

Une chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr, de l'ARN total extrait de Drosophiles est représentée par la figure -12- Au cours de l'élution on voit sortir successivement :

- ARN 4S = ARN de transfert (0,4 M NaCl)

- ARNr 5S (0,42 - 0,45 M NaCl)

- ARNr 28S et 18S (0,7 M NaCl), ils sont élués en un seul pic présentant un épaulement.

- Le pic situé entre l'ARNr 5S et les ARNr (28S et 18S) correspond à de l'ADN extrait en même temps que les ARN ; il persiste après traitement à la ribonucléase.

2) Résultats

Les niveaux de saturation, ADN-ARNr, correspondant aux ADN énumérés ci-dessus, ont été établis (tableau -13-). Les chiffres donnés sont la moyenne de 4 à 7 mesures. Chaque expérience a été faite en double. Le tableau rappelle en outre le phénotype des différentes mutations bobbed.

Figure 11. Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite de l'ADN extrait des mouches sauvages. L'ADN est élué en passant un gradient de tampon phosphate, pH 6,8 (0,1 M - 0,45 M)

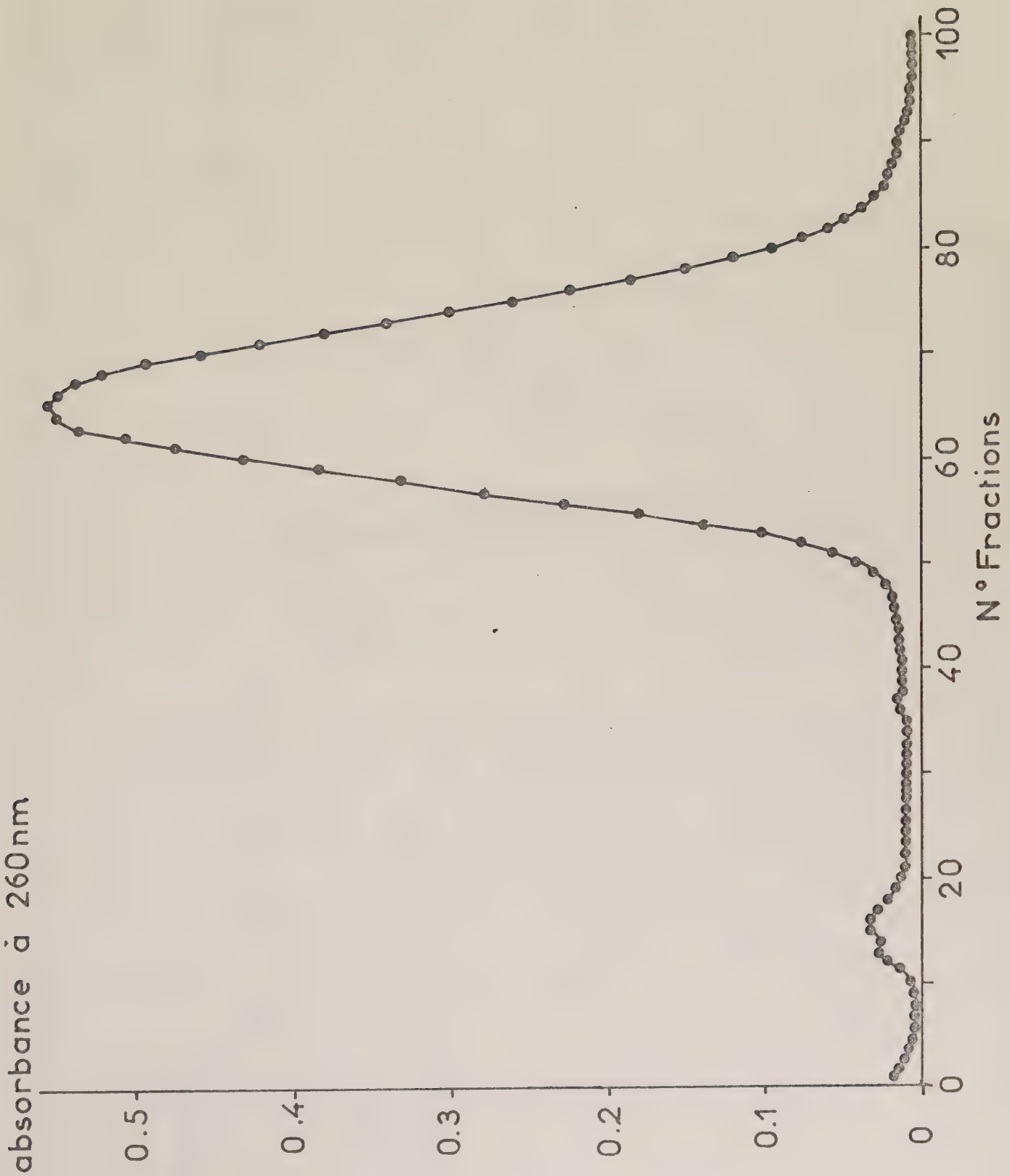
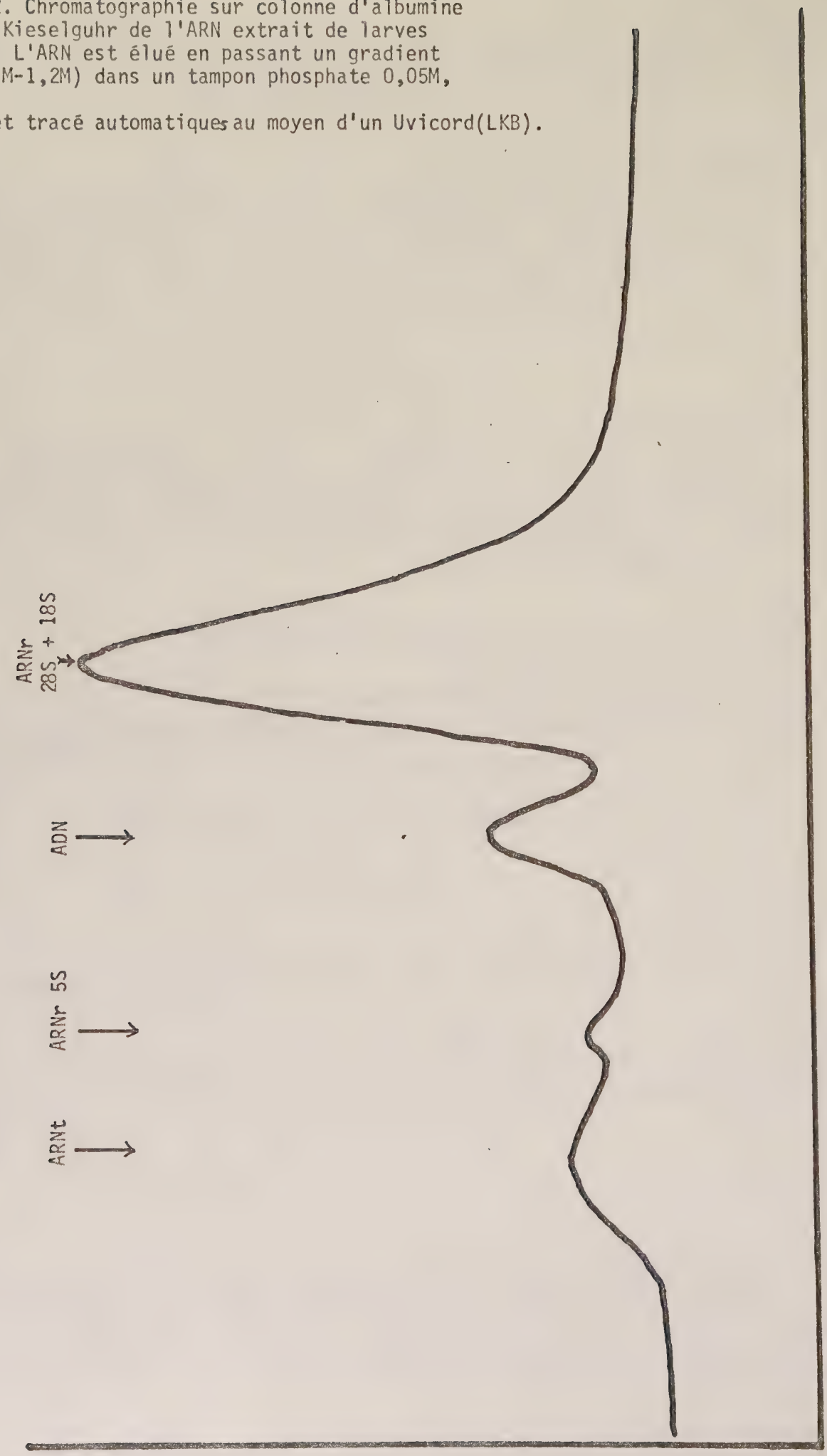


Figure 12. Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr de l'ARN extrait de larves sauvages. L'ARN est élué en passant un gradient NaCl (0,1M-1,2M) dans un tampon phosphate 0,05M, pH 6,8.
Lecture et tracé automatiques au moyen d'un Uvicord(LKB).



Les pourcentages d'ADNr estimés (dernière colonne du tableau) permettent de distinguer deux classes de mutations :

- Les mutations bb^{P5}, bb^{P6} et bb^{P8}, correspondant à une déficience partielle voire même presque totale (bb^{P8}) en ADNr leur expression phénotypique est en rapport avec le pourcentage d'ADNr estimé.

- Les mutations bb^{P2}, bb^{P3} et bb^{P4}, qui gardent une quantité d'ADNr voisine de celle de la souche de référence, et la mutation bb^{P1} dont la perte en ADNr ne peut expliquer, à elle seule le phénotype bobbed. Il convient de rappeler que toutes ces mutations sont léthales en face de Ybb^{-}. A l'exception de bb^{P2} subléthale, elles sont également léthales à l'état homozygote et ont un effet additif nul ou très faible entre elles et avec les mutations bobbed classiques (yvbb, $B^{S}Ybb$).

3) Discussion

Les mutations bb^{P5} et bb^{P6}, induites sur le chromosome X en position normale, ainsi que la mutation bb^{P8} induite sur le chromosome M-5 (asc), confirment l'interprétation donnée par RITOSSA et coll. (1966a) utilisant d'autres mutations bobbed d'origine différente, selon laquelle le phénotype bobbed s'explique par une déficience partielle ou totale en ADNr.

Récemment, PROCUNIER et coll. (1974) ont obtenu des résultats similaires en induisant par le même agent mutagène (EMS) des mutations bobbed sur le chromosome Y. Il faut cependant noter que les déficiences dont il s'agit ici sont de petite taille et ne s'étendent pas au delà du locus bobbed ; en effet toutes les mutations bobbed obtenues sont viables à l'état hémizygote chez les mâles en face d'un locus bobbed normal ou partiellement délété.

Le mutant bb^{P1} présente un faible déficit en ADNr, qui n'est pas suffisant pour rendre compte de son phénotype.

Les mutations bb^{P2}, bb^{P3} et bb^{P4} constituent une classe tout à fait nouvelle de mutations bobbed ; elles présentent en effet des quantités d'ADNr déterminées chez les femelles bb^{P}/In Am, analogues à celle de la souche de référence bb^{+}.

T A B L E A U -13-

Estimation des pourcentages d'ADN hybridable à l'ARNr correspondant aux différents mutants bobbed induits à l'EMS.

Génotype	Phénotype	ADN hybridable	Génotype haploïde	Phénotype haploïde**	ADN hybridable*
In (1)$Sc^{4L}Sc^{8R}/B^{S}Ybb^{+}$	(+)	0,145	Y^{B5}	(+)	0,145
In Am/In Am	(+)	0,337	In Am	(+)	0,168
$M\text{-}5B^{+}/B^{S}Ybb^{+}$	(+)	0,276	$M\text{-}5B^{+}$	(+)	0,131
$bb^{P8}/B^{S}Ybb^{+}$	(+)	0,149	bb^{P8}	léthal	0,004
$bb^{P5}/B^{S}Ybb^{+}$	(+)	0,200	bb^{P5}	bb très fort[a]	0,055
$bb^{P6}/B^{S}Ybb^{+}$	(+)	0,23	bb^{P6}	bb léger[b]	0,085
$bb^{P2}/B^{S}Ybb^{+}$	(+)	0,279	bb^{P2}	léthal	0,134
bb^{P2}/In Am	(+)	0,310	bb^{P2}	léthal	0,142
bb^{P2}/bb^{P2}	Subléthal	0,290	bb^{P2}	léthal	0,145
bb^{P1}/In Am	(+)	0,265	bb^{P1}	léthal	0,097
bb^{P3}/In Am	(+)	0,295	bb^{P3}	léthal	0,127
bb^{P4}/In Am	(+)	0,316	bb^{P4}	léthal	0,148

*ADN hybridable par génotype haploïde déduit des colonnes 1 et 3

**Phénotype des ♂ $X^{bb}/0$ et X^{bb}/Y^{-bb}

a : bb léger = poils courts

b : bb fort = poils courts, abdomen déformé, faible fertilité.

TARTOF (1971) a montré en comparant la quantité d'ADNr par organisateur nucléolaire chez des mouches bb^+/bb^+ et $bb^+/0$ ayant respectivement deux organisateurs nucléolaires et un organisateur nucléolaire, qu'il y a une augmentation de l'ADNr chez les $bb^+/0$. En effet on s'attendait à mesurer moitié moins d'ADNr chez les $bb^+/0$ que chez les bb^+/bb^+, on en trouve davantage.

En mesurant l'ADNr à partir de l'ADN extrait des mouches adultes, TARTOF (1971) trouve une augmentation égale à 50 % par rapport à ce qui est attendu soit 75 % d'ADNr chez les $bb^+/0$ par rapport à la quantité d'ADNr déterminée chez les bb^+/bb^+. Cette réplication disproportionnelle, appelée "compensation de l'ADNr" provient de l'organisateur nucléolaire de l'X, mais l'ADNr du chromosome Y est réfractaire à cette réplication disproportionnelle.

Plus récemment, SPEAR et GALL (1973) ont montré que cet excès d'ADNr est spécifique des tissus polytènes (glandes salivaires) : dans ces tissus, les auteurs trouvent autant d'ADNr chez des individus $bb^+/0$ et bb^+/bb^+, alors que dans les tissus diploïdes (cerveaux et disques imaginaux), ils mesurent moitié moins d'ADNr chez les $bb^+/0$.

Ce mécanisme de compensation pourrait peut être expliquer en partie les quantités excessives d'ADNr que nous avons estimées pour certains mutants.

En ce qui concerne bb^{P1}, bb^{P3} et bb^{P4}, les quantités d'ADNr estimées pour chacun d'eux l'ont été uniquement à partir de femelles In Am/bb^P. Si ces mutants correspondaient à des déficiences quasi totales en ADNr (comme semble l'indiquer leur phénotype), le mécanisme de compensation devrait pouvoir intervenir. On a trouvé 0,337 % d'ADNr chez des femelles In Am/In Am (bb^+/bb^+), on devrait trouver environ 75 % de cette valeur, soit 0,252 % d'ADNr chez des femelles In Am/bb^o. Or on trouve chez les femelles In Am/bb^{P1}, In Am/bb^{P3} et In Am/bb^{P4} respectivement 0,265 %, 0,295 % et 0,316 % d'ADNr. Ces valeurs sont un peu trop élevées, surtout celles concernant bb^{P3} et bb^{P4}.

Deux hypothèses restent donc possibles : ou bien ces mutants (ou certains d'entre eux) contiennent de l'ADNr non fonctionnel, la présence de cet ADNr empêchant l'intervention du mécanisme de compensation ; dans ce cas les quantités d'ADNr pour chaque mutant seraient celles qui

---

bb^o = déficience complète de l'ADNr.

sont représentées dans le tableau -13-. Ou bien ces mutants sont totalement ou partiellement déficients en ADNr, et c'est le mécanisme de compensation qui rend compte des valeurs élevées trouvées. Pour tester ces hypothèses, il existe la possibilité de mesurer l'ADNr correspondant à chacune de ces mutations chez les mâles bb^{P}/Ybb^{+} (selon TARTOF, il n'y a pas de compensation chez les mâles bb^{o}/Ybb^{+}). Ce travail est en cours.

Pour le mutant bb^{P2} en tout cas, les résultats obtenus chez les mâles bb^{P2}/Ybb^{+} et chez les femelles homozygotes bb^{P2}/bb^{P2} (tableau -13-) éliminent cette dernière hypothèse : le chromosome portant bb^{P2} contient bien autant d'ADNr que le chromosome M-5 de référence. Le phénotype bobbed dans ce cas, pourrait être attribué à une production d'ARNr modifié soit qualitativement soit quantitativement.

L'analyse plus détaillée de la mutation bb^{P2} (viable à l'état homozygote), et en particulier l'étude de l'ARNr synthétisé, pourrait servir peut être de voie d'approche pour l'étude du mécanisme qui gouverne l'expression du locus bobbed chez la Drosophile.

CHAPITRE IV : ETUDE D'UN MUTANT BOBBED AYANT UNE QUANTITE NORMALE D'ADN RIBOSOMAL : LE MUTANT bb^{P2} (MARRAKECHI 1975)

1) Introduction

Les différents mutants bobbed ayant un haut niveau d'ADNr présentent un intérêt particulier. Leur étude pourrait servir de voie d'approche pour la compréhension des mécanismes de régulation du fonctionnement des gènes chez les Eucaryotes. Les mutants bb^{P1}, bb^{P3} et bb^{P4} meurent à des stades très jeunes (premier stade larvaire) ; leur étude est rendue d'autant plus difficile qu'elle doit être faite en utilisant les oeufs. Or, il n'existe pas de marqueurs génétiques permettant de distinguer les oeufs de génotype bb/bb ; d'autre part, des techniques de perméation des oeufs aux substances externes, telles que les précurseurs radioactifs, n'ont été mises au point que récemment (LIMBOURG et ZALOKAR 1973) et sont à l'heure actuelle encore difficilement utilisables lorsque l'on veut traiter des oeufs en masse.

Pour ces raisons, seul le mutant bb^{P2}, viable à l'état homozygote (5 %) a pu être étudié. Les recherches ont été poursuivies dans trois directions :

- Comparaison qualitative de l'ARNr du mutant bb^{P2} avec celui de la souche sauvage.

- Comparaison des taux de biosynthèse des ARNr chez le mutant bb^{P2} et chez le sauvage.

- Comparaison de la synthèse protéique chez le mutant bb^{P2} et la souche de référence.

2) Hybridation moléculaire ADN-ARNr

Dans le précédent Chapitre (tableau -13-), nous avons montré en utilisant l'ADN extrait des mouches entières que la quantité d'ADN hybridable à l'ARN ribosomal correspondant au locus bb^{P2} n'est pas significativement différente de celle correspondant au locus bb^{+} des mouches de référence (0,28 % d'ADN ribosomal par rapport à l'ADN total chez une femelle bb^{P2}/bb^{P2}, soit 0,14 % pour un chromosome M-5 bb^{P2}, alors que le niveau d'ADNr pour M-5 bb^{+} a été estimé à 0,13 %. Des valeurs proches de 0,14 % ont été déterminées à partir des ADN extraits des femelles bb^{P2}/bb^{+} (0,145 %) et des mâles $bb^{P2}/B^{S}Ybb^{+}$ (0,134 %)).

Il faut remarquer que le pourcentage d'ADN ribosomal par rapport à l'ADN total qui est observé, est une valeur moyenne pour différents tissus dont on sait que chacun n'a pas la même valeur : en effet, il a été démontré chez certains insectes en particulier *Drosophila hydei* (HEMNING et MEER 1971) et *Drosophila melanogaster* (SPEAR et GALL 1973), que le pourcentage d'ADN ribosomal est plus faible dans les tissus polyténiques (glandes salivaires) que dans les tissus diploïdes (embryons ou disques imaginaux et cerveaux). D'autre part, chez les Amphibiens (EVANS et BIRNSTIEL 1968) et chez certains insectes (GALL et coll. 1969 et LIMA de FARIA et coll. 1969), l'ADN ribosomal est amplifié dans les oocytes.

MOHAN et RITOSSA (1970) ont montré que le pourcentage d'ADN ribosomal est identique dans les ovaires et dans la carcasse de *Drosophila melanogaster*. Nous pouvons interpréter ces résultats en supposant que, le rapport des tissus polyténiques aux tissus diploïdes est identique dans les ovaires et dans la carcasse et qu'il n'existe pas d'amplification dans les oocytes, ou que si une amplification se produit elle est limitée.

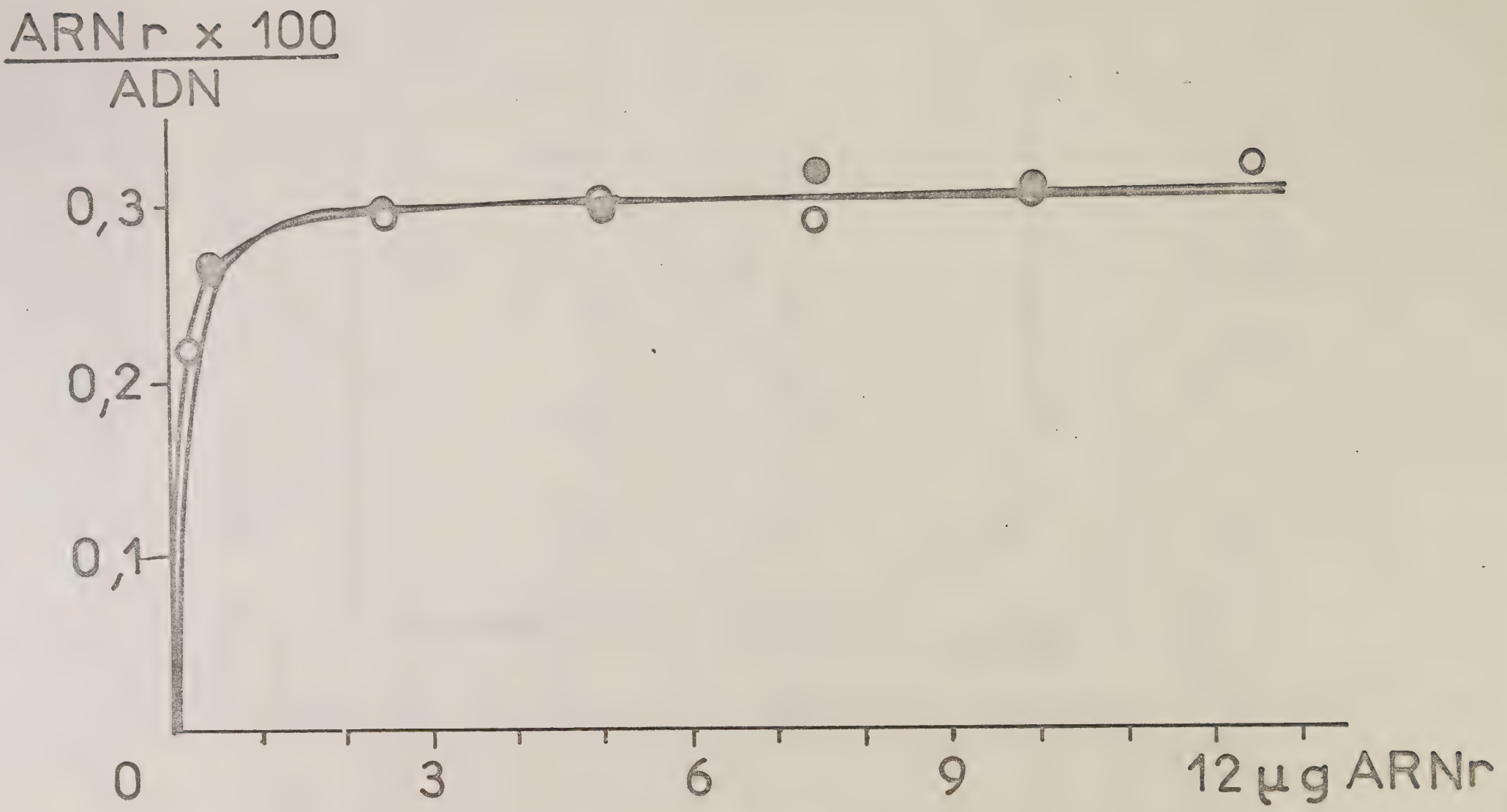
Nous pourrions supposer que l'excès d'ADN ribosomal que nous observons chez le mutant bb^{P2} par rapport à ce qui est attendu d'après son phénotype, est dû à une amplification spécifique de l'ADN ribosomal dans les oocytes. Nous avons donc recherché quel était le niveau d'hybridation ADN-ARNr dans les ovaires et dans les carcasses de femelles bb^{P2}/bb^{P2}. Les résultats représentés dans la figure -13- montrent un niveau d'hybridation ADN-ARNr identique pour les ovaires et les carcasses. Il n'y a donc pas d'amplification spécifique dans les ovaires des femelles bb^{P2}/bb^{P2} pouvant expliquer le haut niveau en ADN ribosomal.

Figure 13. Hybridation de l'ADN extrait des ovaires et des carcasses de mouches bb^{P2}/bb^{P2} avec de l'ARN ribosomal extrait de larves sauvages :

●—● ADN extrait des ovaires

○—○ ADN extrait des carcasses

L'activité spécifique de l'ARN ribosomal est de 152.000 cpm/µg.



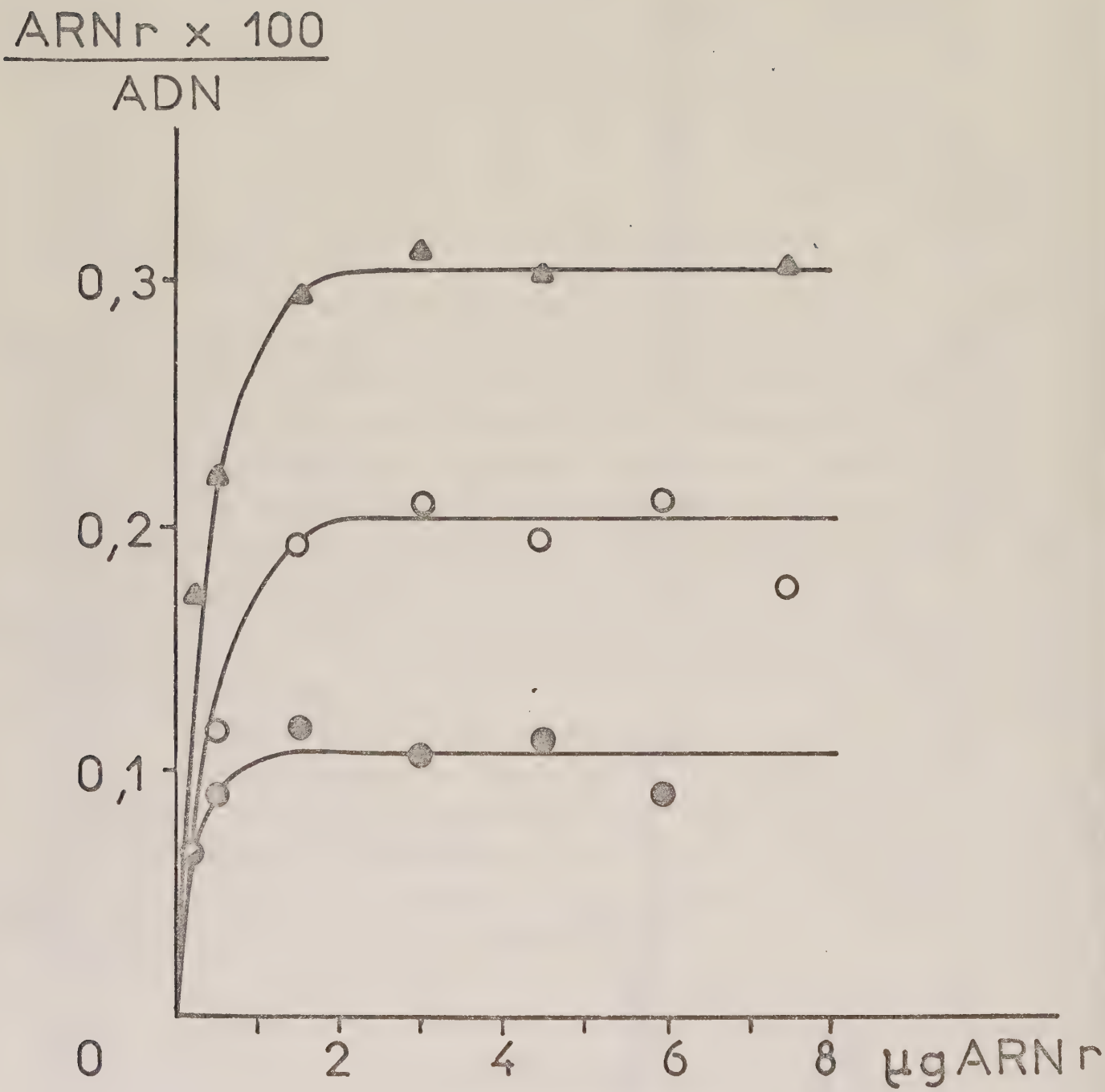


Figure 14. Plateaux de saturation obtenus en hybridant l'ADN extrait de femelles adultes bb^{P2}/bb^{P2} avec de l'ARN ribosomal tritié extrait de larves sauvages :

- ADN hybridé avec de l'ARN 28S + 18S
- ADN hybridé avec de l'ARN 28S
- ADN hybridé avec de l'ARN 18S

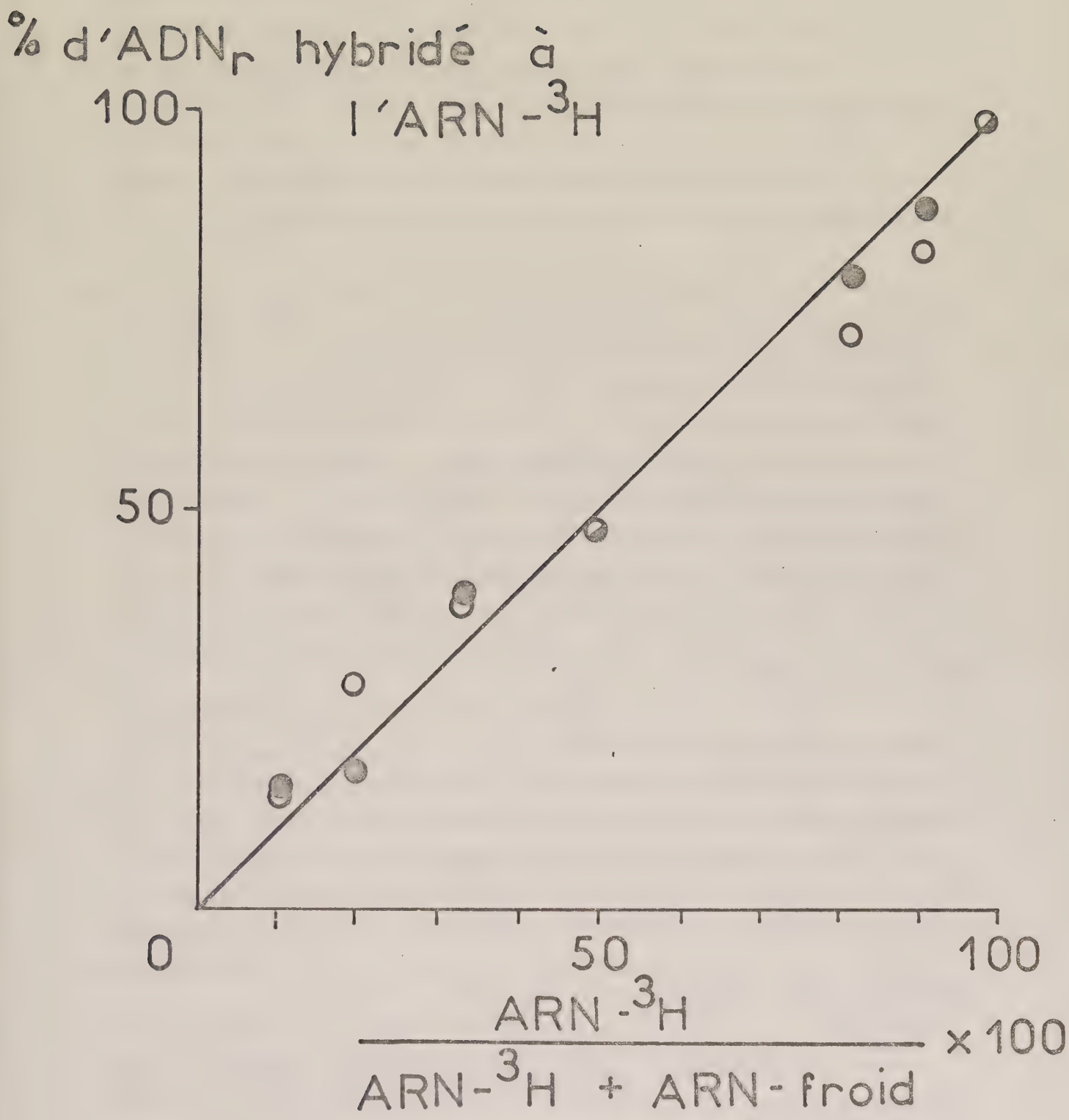


Figure 15. Expérience d'hybridation mettant en compétition pour l'hybridation avec de l'ADN extrait de souche bb^+, l'ARN ribosomal extrait de femelles bb^{P2}/bb^{P2} avec l'ARN ribosomal tritié extrait de larves sauvages. Les cercles pleins ● et les cercles ouverts ○ indiquent les résultats de deux expériences.

Deux autres questions se posent et pour lesquelles la technique d'hybridation ADN-ARNr pourrait éventuellement donner une réponse :

- Le rapport du nombre de séquences codant pour les ARN 28S et 18S n'a-t-il pas été modifié ?

- L'éthyl méthane sulfonate, agent alkylant a-t-il provoqué une altération qualitative importante de ces séquences ?

Afin de tester ces deux possibilités nous avons entrepris les expériences suivantes : dans une première expérience, l'ARN ribosomal extrait des mouches bb^{P2}/bb^{P2} a été purifié sur gradient de saccharose. Les deux espèces 28S et 18S ont ainsi été séparées et le niveau d'hybridation a été déterminé pour chacune d'elle. Le résultat représenté dans la figure -14- montre des taux d'hybridation des ARN 28S et 18S respectivement de 0,203 et de 0,106 %, soit un rapport de 2 à 1. Ce même rapport a été obtenu chez la souche de référence bb^{+} (QUAGLIAROTTI et RITOSSA 1968). Il correspond, compte tenu de la taille des molécules 28S et 18S à un nombre égal de séquences codant pour ces deux espèces moléculaires, ce qui est attendu puisqu'elles sont synthétisées à partir d'un précurseur commun (PETRI et coll. 1971).

Dans une seconde expérience d'hybridation, l'ARN ribosomal extrait des homozygotes bb^{P2}/bb^{P2} est mis en compétition pour l'hybridation à l'ADN extrait de mouches bb^{+} avec l'ARN ribosomal marqué à l'Uridine tritiée et extrait des larves de la souche Oregon R. Comme le montre la figure -15-, on n'observe par cette technique aucune différence entre les ARN produits par les deux souches. Il faut toutefois noter que cette technique ne nous permettrait de détecter qu'une modification des gènes ribosomaux suffisamment importante pour diminuer la stabilité des hybrides ADNr sauvage/ARNr mutant.

3) Etude de la synthèse des ARN ribosomaux dans les ovaires incubés *in vitro*

Afin de comparer le taux de biosynthèse des ARN ribosomaux chez les femelles bb^{P2}/bb^{P2} et bb^{+}/bb^{+}, nous avons incubé les ovaires extraits de femelles vierges agées de 7 à 8 jours dans un milieu

physiologique (Ringer) contenant de l'Uridine-5-^{3}H pendant 30 minutes et à une température de 25°C. Les figures -16a- et -16b- représentent les profils de radioactivité et de densité optique à 260 nm des ARN synthétisés *in vitro* et purifiés sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr. La plus grande partie des ARN synthétisés *in vitro* ne correspond pas à des ARN 28S et 18S comme le montre la position du pic de radioactivité par rapport au pic d'absorbance à 260 nm. La caractérisation de ce matériel sur gel de polyacrylamide (figure -17-) met en évidence deux pics principaux correspondant à des ARN de coefficient de sédimentation 38S et 30S et un troisième pic d'environ 23S.

In vitro et dans les conditions d'incubation utilisées, les précurseurs 38S, 30S et 23S des ARN ribosomaux ne subissent donc pas les transformations conduisant aux ARN 28S et 18S. Cette même conclusion avait déjà était déduite des travaux de GREENBERG (1967) utilisant les glandes salivaires de Drosophile ainsi que ceux de MAZABRAUD (1973) utilisant des ovaires. De plus, MOHAN et RITOSSA (1970) travaillant sur des mutants bobbed déficients en ADN ribosomal ont montré que le taux de synthèse de ces ARN de haut poids moléculaire produits dans ces conditions est fonction du nombre de cistrons codant pour les ARN ribosomaux 28S et 18S. On observe également sur la figure -16- un décalage entre les pics de radioactivité et de densité optique à 260 nm correspondant aux ARN solubles. Ce décalage pourrait s'interpréter par une absence de maturation des précurseurs de certains ARN solubles.

Le tableau -14- indique la radioactivité spécifique des ARN solubles obtenue au cours de deux expériences. Les ARN solubles sont pris comme témoin interne, permettant de contrôler la taille du pool de l'Uridine. La radioactivité spécifique des ARN ribosomaux, reflet du taux de synthèse de ces ARN est supérieure chez la souche bb^{P2}. Quant aux ARN solubles, leur taux de synthèse reste normal et identique dans les deux souches.

La caractérisation des ARN ribosomaux obtenus dans les mêmes conditions que précédemment sur gradient de saccharose est représentée dans les figures -18a et 18b-. Tout d'abord, la comparaison entre les profils de radioactivité et de densité optique confirme la synthèse excédentaire des ARN ribosomaux dans la souche bb^{P2}/bb^{P2}. On peut observer en outre que la proportion des précurseurs 30S par rapport au 38S est plus élevée dans la souche mutante. Sur la figure -16-, on remarquait

T A B L E A U -14-

Synthèse des ARN *in vitro* : ovaires extraits de femelles vierges âgées de 7 à 8 jours .
Les ovaires sont incubés dans une goutte de Ringer contenant 0,5 mCi/ml d'uridine-5-^{3}H (30 min. à 25°C).
Les ARN sont séparés sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr.

Génotypes	Phénotypes.	Expériences N°	Radioactivité spécifique en cpm/µgr d'ARN		ARNr / ARN solubles
			ARNr	ARN solubles.	
♀ M-5 bb^{+}/M-5bb^{+}	(bb^{+})	a	194	150	1,29
		b	199	165	1,21
♀ M-5bb^{p2}/M-5bb^{p2}	(bb très fort)	a	381	170	2,24
		b	342	162	2,11

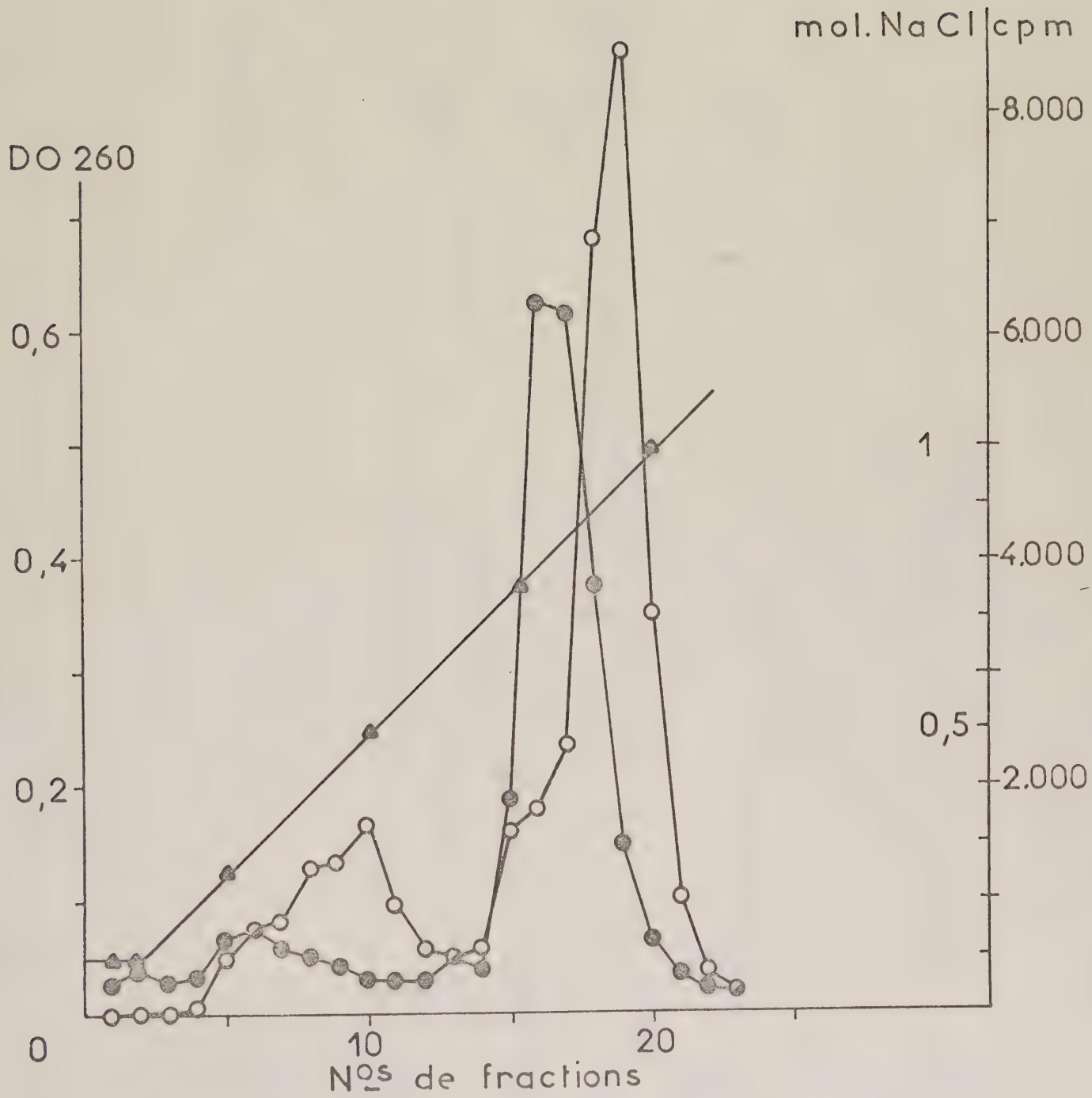


Figure 16a. Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr de l'ARN extrait des ovaires bb^+/bb^+ incubés pendant 30 minutes dans une solution de Ringer contenant l'uridine tritiée (0,5 mCi/ml). L'ARN est élué en passant un gradient NaCl (0,1 M-1,2 M) dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 6,8.

Densité optique
Radioactivité
Molarité en NaCl

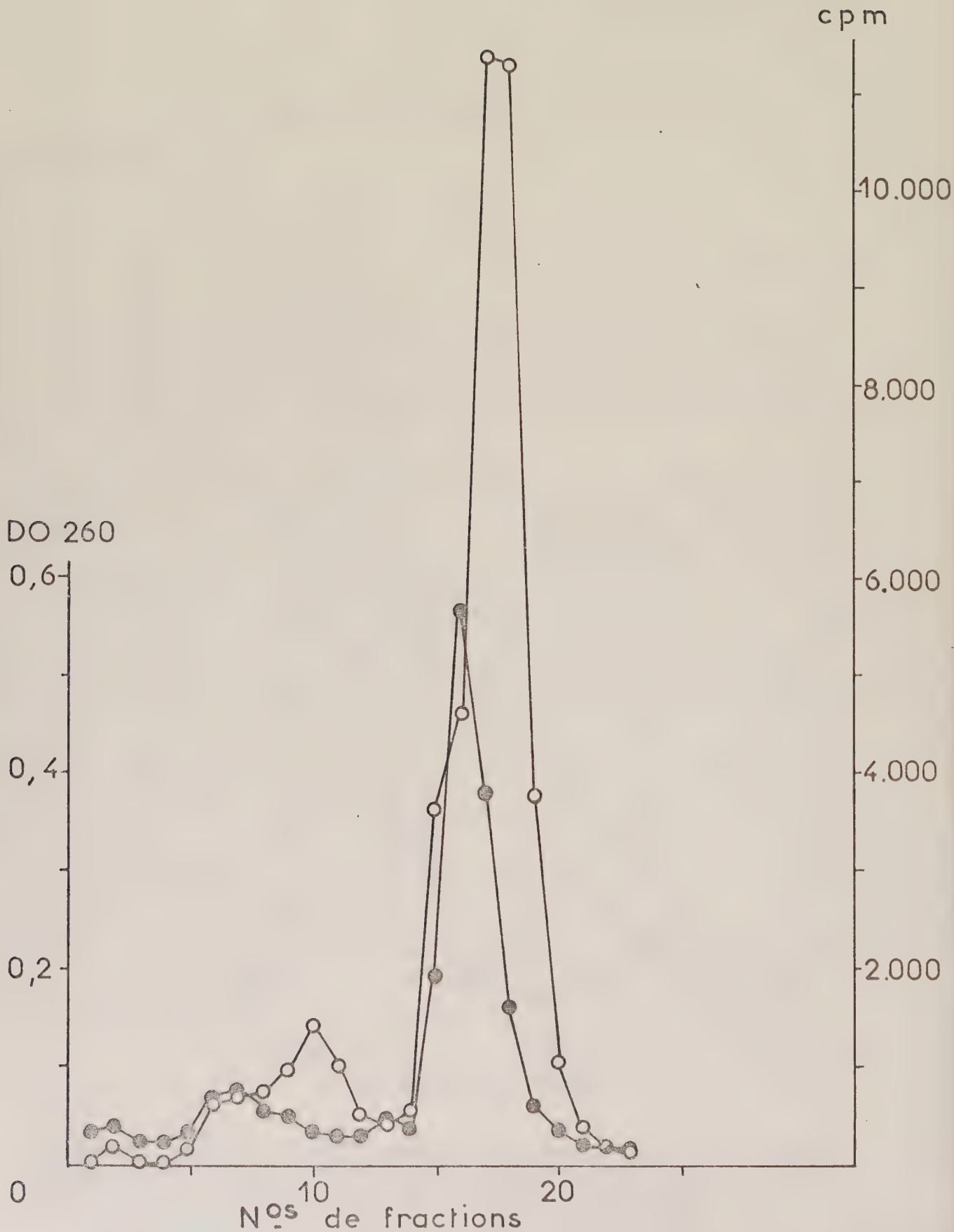
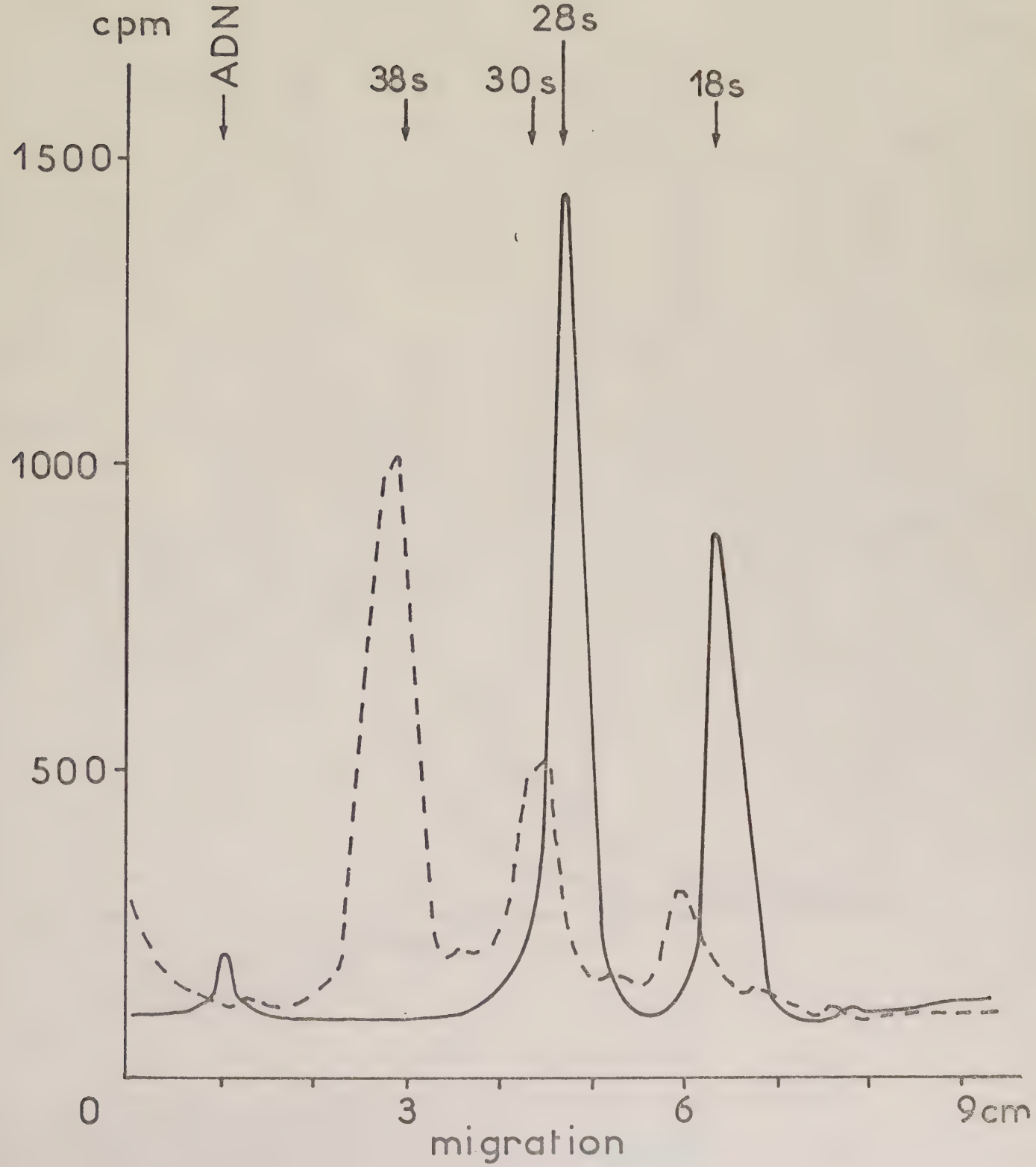


Figure 16b. Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr de l'ARN extrait des ovaires bb^{P2}/bb^{P2}.
Mêmes conditions que 16a.

Figure 17. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'ARN extrait des ovaires bb^+/bb^+ incubés *in vitro* dans les mêmes conditions que celles de la figure 16.

——— absorption enregistrée à 260 nm
----- radioactivité
(La durée de la migration est de 150 min.)



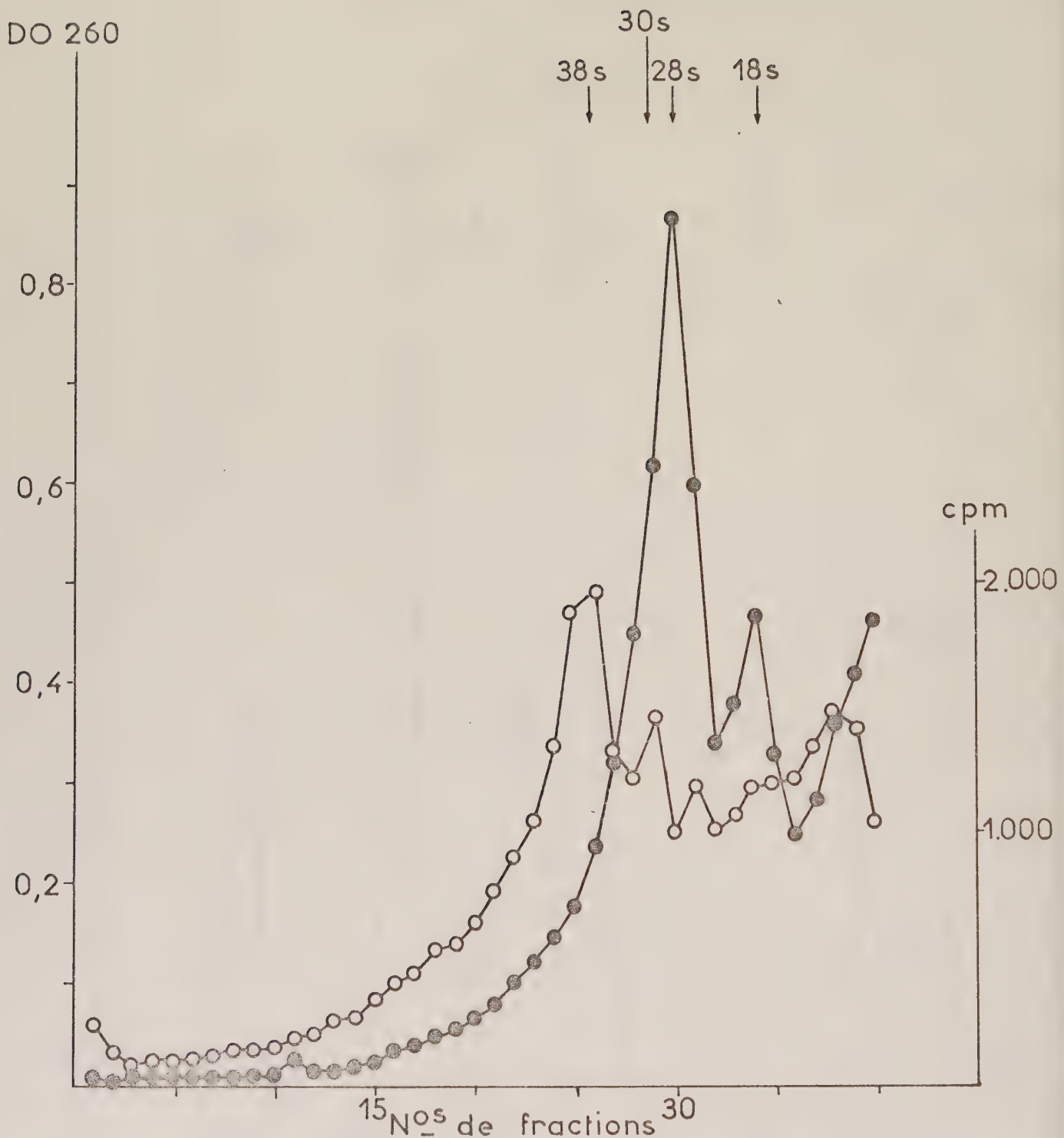


Figure 18a. Centrifugation sur gradient de saccharose (5-17 %) de l'ARN extrait des ovaires bb^+/bb^+ incubés 30 minutes dans une solution contenant de l'uridine tritiée. Centrifugation 5 heures à 4°C dans un rotor SW 25-1 à la vitesse de 24.000 tours par minute.

densité optique

radioactivité

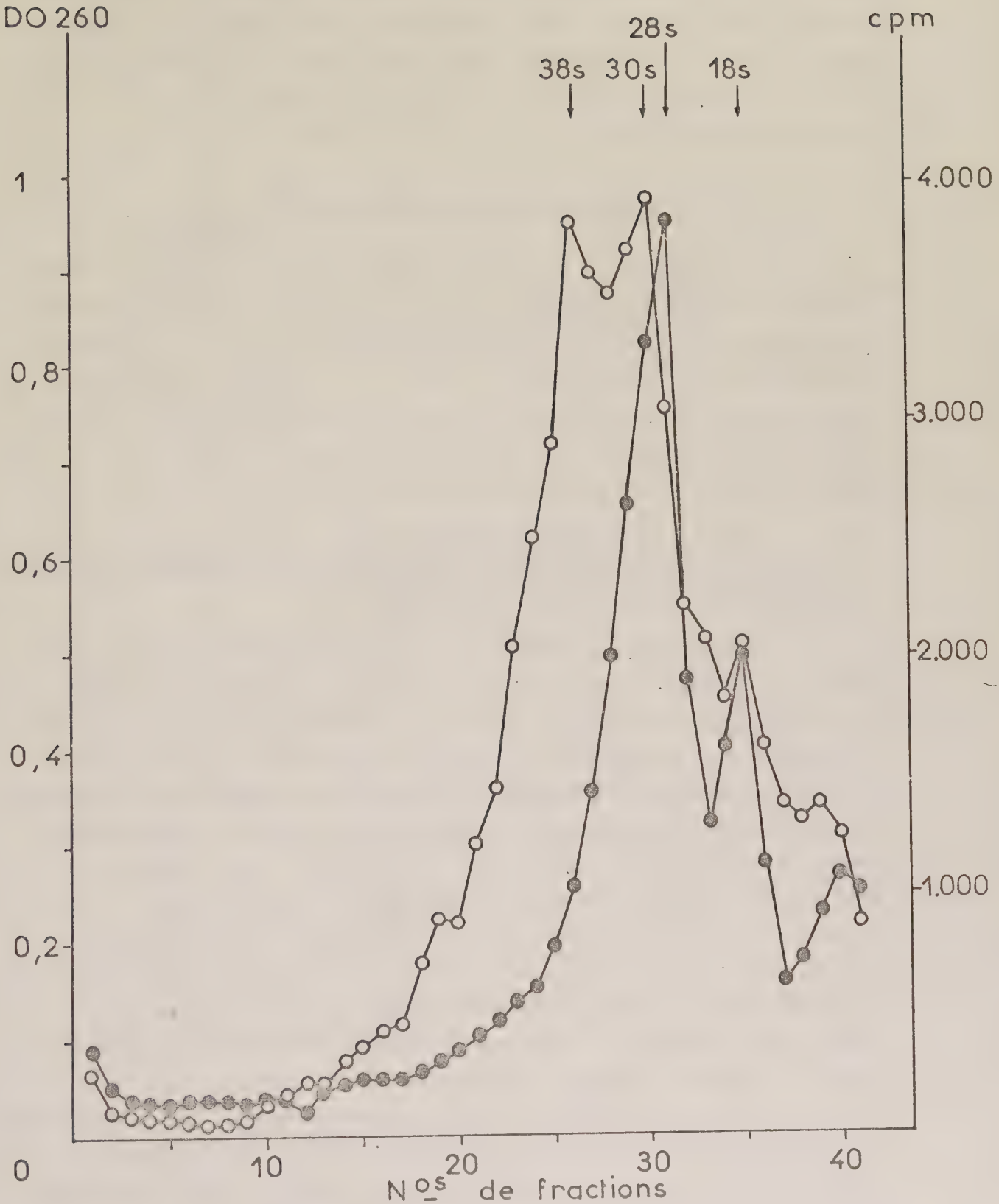


Figure 18b. Centrifugation sur gradient de saccharose (5-17 %) de l'ARN extrait des ovaires bb^{P2}/bb^{P2} incubés *in vitro* (mêmes conditions que la figure 18a).

un décalage plus petit dans la souche bb^{P2} que dans la souche bb^{+}, entre le pic de radioactivité et celui de densité optique. Ce décalage pourrait s'expliquer aussi par une proportion plus élevée de 30S par rapport au 38S. Chez le mutant l'excès de 30S pourrait s'interpréter soit par une transformation plus rapide du précurseur 38S en 30S, soit par une dégradation plus lente de cette molécule.

4) Etude de la synthèse des ARN *in vivo*

L'étude de la synthèse des ARN *in vitro* a permis de comparer le taux de biosynthèse des ARNr chez le mutant bb^{P2} et chez une souche de référence bb^{+}. Cependant le découpage des précurseurs en sous-espèces moléculaires stables 28S et 18S ne peut se faire dans ces conditions expérimentales. Des expériences *in vivo* nous permettront d'une part de vérifier les résultats obtenus *in vitro* et d'autre part de suivre la cinétique de formation des ARNr 28S et 18S.

a - Etude quantitative globale (isolement des ARN ribosomaux sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr) :

Pour marquer les ARN, nous avons injecté dans l'abdomen des mouches de l'Uridine tritiée en solution dans du "Ringer" à pH neutre. Il est difficile de contrôler la quantité injectée par mouche ainsi que la capacité pour chaque mouche d'utiliser l'Uridine-5-^{3}H reçue. Les résultats sont donc exprimés chaque fois que cela est possible en comparant la synthèse des ARN ribosomaux à celle des ARN solubles. Nous donnons à titre d'exemple dans le tableau -15- les résultats d'une expérience réalisée en utilisant des femelles vierges âgées de 7 à 8 jours. Après injection, ces femelles sont placées à 25°C pendant 120 minutes, puis les ARN sont extraits et isolés sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr. On observe que la radioactivité spécifique des ARN ribosomaux est plus élevée pour la souche bb^{P2} que pour la souche de référence, ce qui confirme les résultats obtenus *in vitro* avec les ovaires.

Chez les femelles adultes, les synthèses sont particulièrement importantes dans les ovaires. On peut se demander si la différence observée dans les taux de synthèse des ARN ribosomaux chez les mouches bb^{P2} et bb^{+} n'est pas due à une différence d'activité au niveau de cet

Tableau 15: Synthèse des ARN *in vivo*: Les ARN sont marqués en injectant à des femelles vierges, âgées de 7-8 jours, de l'uridine tritiée. Les femelles sont gardées 120 min. à 25°C avant l'extraction des ARN.
Les ARN sont séparés sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr.

Génotype	Radioactivité spécifique en cpm/µgr		ARNr / ARN solubles
	ARNr	ARN solubles	
♀M-5 bb^+/M-5 bb^+ ♂	388	336	1,15
♀M-5 bb^+/M-5 bb^+ ♂	576	323	1,78

organe. Pour tester cette hypothèse, une expérience similaire à la précédente a été réalisée mais 120 minutes après l'injection les ovaires sont disséqués et les ARN sont extraits à partir des ovaires d'une part et à partir du restant des mouches (carcasses) d'autre part. Les résultats sont résumés dans le tableau -16-. Ils confirment notre hypothèse puisque chez le mutant la radioactivité spécifique des ARN ribosomaux est plus importante dans les ovaires que dans les carcasses. Il semble donc que la différence constatée en étudiant la synthèse des ARN chez les mouches entières provienne d'une activité supérieure des ovaires chez les mouches bb^{P2}.

Les mouches bb ayant un retard dans leur développement larvaire, la question se posait de savoir si les mouches $[bb^{P2}]$ et $[bb^{+}]$ ayant 7 à 8 jours depuis l'émergence de l'imago n'étaient pas physiologiquement d'âge différent. Une observation de MOHAN et RITOSSA (1970) va à l'appui de cette supposition : en comparant la ponte de mouches [bb] et $[bb^{+}]$ en fonction de l'âge, ils constatent que l'âge correspondant au maximum d'oeufs pondus est plus grand pour les mouches [bb] que pour les mouches $[bb^{+}]$. L'excès de synthèse des ARN ribosomaux observé dans les ovaires des femelles $[bb^{P2}]$ âgées de 7 à 8 jours par rapport à celui des femelles $[bb^{+}]$, pourrait alors peut être s'expliquer par une différence d'âge physiologique.

Le tableau -17- montre que l'activité spécifique des ARN ribosomaux par rapport aux ARN solubles diminue en fonction de l'âge des mouches, qu'elles soient sauvages ou mutantes. Il montre aussi que l'écart observé entre mutant et sauvage de même âge, maximum quand les mouches ont 1 jour, diminue progressivement puis s'annule quand les mouches ont entre 16 et 20 jours.

En conclusion de cette étude concernant le taux de synthèse des ARN ribosomaux *in vivo*, on peut dire qu'en aucun cas, il n'est inférieur chez le mutant bb^{P2}. On note même un excès de synthèse dans les ovaires, mais on peut admettre que cet excès de synthèse est dû au fait qu'à âge égal, les mouches $[bb^{P2}]$ sont physiologiquement plus jeunes. Le phénotype mutant des mouches $[bb^{P2}]$, qui n'est pas dû à une diminution de la quantité d'ADN ribosomal ne semble pas non plus provenir d'une diminution de la vitesse de transcription de cet ADN ribomal, du moins chez les mouches adultes.

Tableau 16: Radioactivité spécifique des ARNr synthétisés *in vivo* dans les mêmes conditions que celles décrites dans le tableau-15- :

-Au niveau des ovaires.

-Au niveau du restant de la mouche(carcasse)

Les ARN sont purifiés sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr.

N.B.:La faible quantité d'ARN extrait ne nous a pas permis de calculer la radioactivité spécifique des ARNs.

Génotype des femelles	Radioactivité spécifique en cpm/µgr d'ARNr	
	Ovaires	Carcasses
bb^{+}/bb^{+}	335	298
bb^{p2}/bb^{p2}	578	230

T A B L E A U -17-

Rapport des activités spécifiques des ARNr/activité spécifique des ARNs (solubles) en fonction de l'âge des mouches (les ARN sont marqués à l'uridine-5-^{3}H pendant 120 min. à 25°C.

Phénotypes \ Ages		1j	7j	16j	20j
♀ [bb^{+}]	Exp.1	2,08	1,15	-	0,96
	Exp.2	1,86	1,05	1,15	0,90
♀ [bb^{p2}]	Exp.1	3,28	1,78	-	0,85
	Exp.2	3,00	1,61	1,25	0,83

b - Etude de la maturation des précurseurs des ARN ribosomaux

Pour savoir si la maturation du précurseur 38S était effective, nous avons, dans une première expérience, injecté de l'Uridine tritiée à des femelles vierges âgées de 7 à 8 jours et extrait les ARN après 4 heures à 25°C.

Le profil des ARN sur gradient de saccharose est représenté sur les figures -19a- et -19b-. On voit que 4 heures après l'injection la radioactivité se retrouve principalement aussi bien chez les femelles [bb^{P2}] que chez les femelles [bb^{+}] au niveau des pics 28S et 18S. La maturation des précurseurs se réalise donc effectivement *in vivo* chez le mutant. Cependant le temps de marquage relativement long ne permet pas de savoir si la cinétique de cette maturation est normale.

c - Expériences faites en isolant les ARN ribosomaux sur gel de polyacrylamide

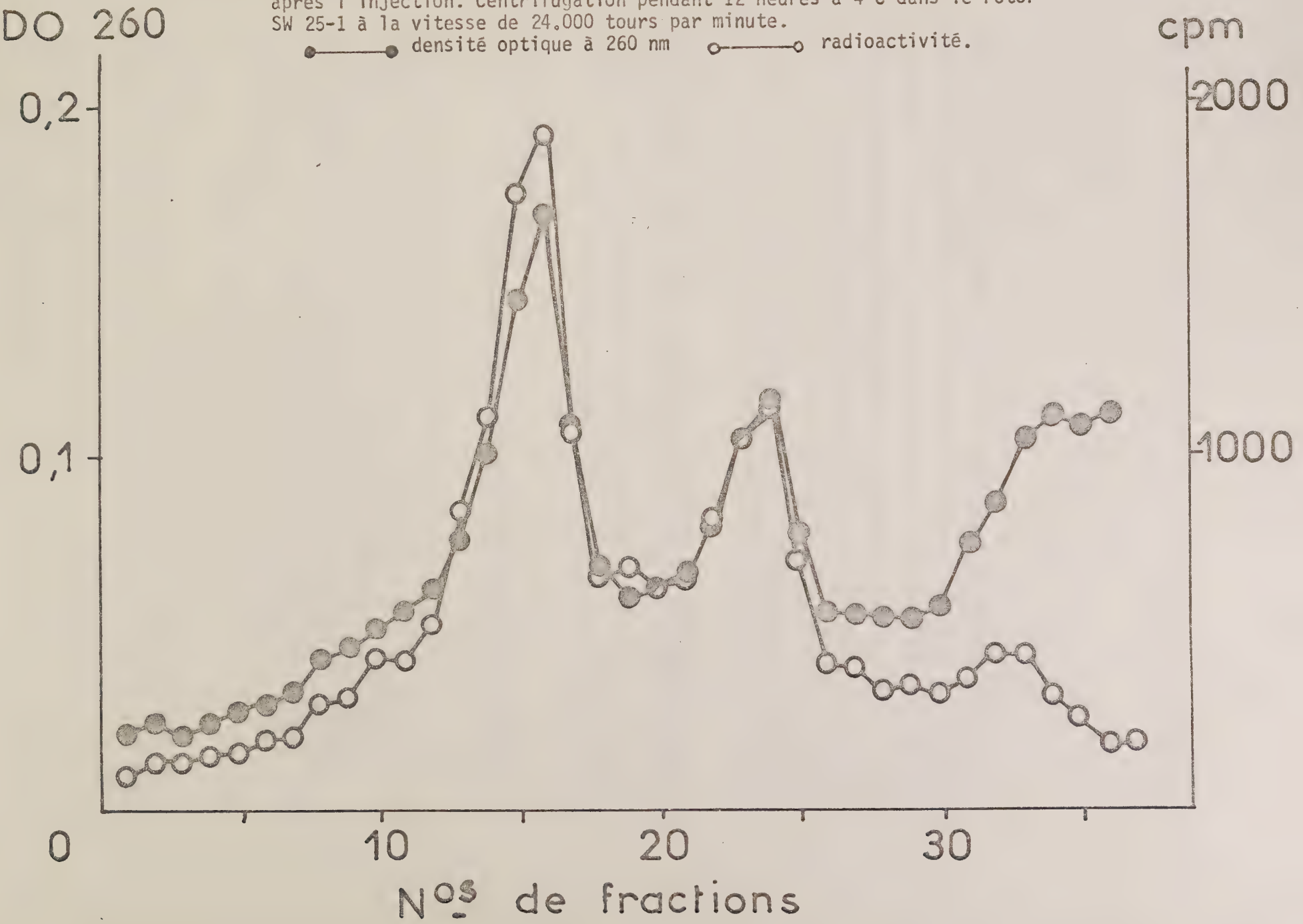
Nous avons repris le même type d'expérience que précédemment en utilisant une technique de séparation des ARN plus sensible et plus résolutive, la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, et avec des temps de marquage variés afin d'étudier la cinétique de maturation des précurseurs.

Les figures -20a- et -20b- montrent les profils de densité optique et de radioactivité des ARN extraits des mouches [bb^{P2}] et [bb^{+}] marquées pendant 30 minutes à l'Uridine tritiée. Les profils de densité optique indiquent clairement pour les deux souches que les quantités de 28S et de 18S sont identiques. Le profil de radioactivité présente chez la souche sauvage deux pics coïncidant avec les pics de densité optique 28S et 18S et un autre pic correspondant au précurseur 38S. Le précurseur 30S apparaît sur la figure sous forme d'un léger épaulement à gauche du 28S. On remarque en outre un petit pic situé entre 28S et 18S. Il pourrait correspondre soit à un précurseur (23S) de l'ARNr 18S (PETRI et coll. 1971), soit à une espèce moléculaire d'ARNr d'origine mitochondriale (ROSSET, R. Communication personnelle).

Le rapport entre les radioactivités totales du 28S + 30S et du 18S est de 2,19. En ce qui concerne les mouches bb^{P2}, nous observons

Figure 19a. Centrifugation sur gradient de saccharose (5-17 %) de l'ARN extrait des femelles adultes bb^+/bb^+. Les femelles sont injectées avec une solution d'uridine tritiée (0,5 mCi/ml) et les ARN sont extraits 4 heures après l'injection. Centrifugation pendant 12 heures à 4°C dans le rotor SW 25-1 à la vitesse de 24.000 tours par minute.

●——● densité optique à 260 nm o——o radioactivité.



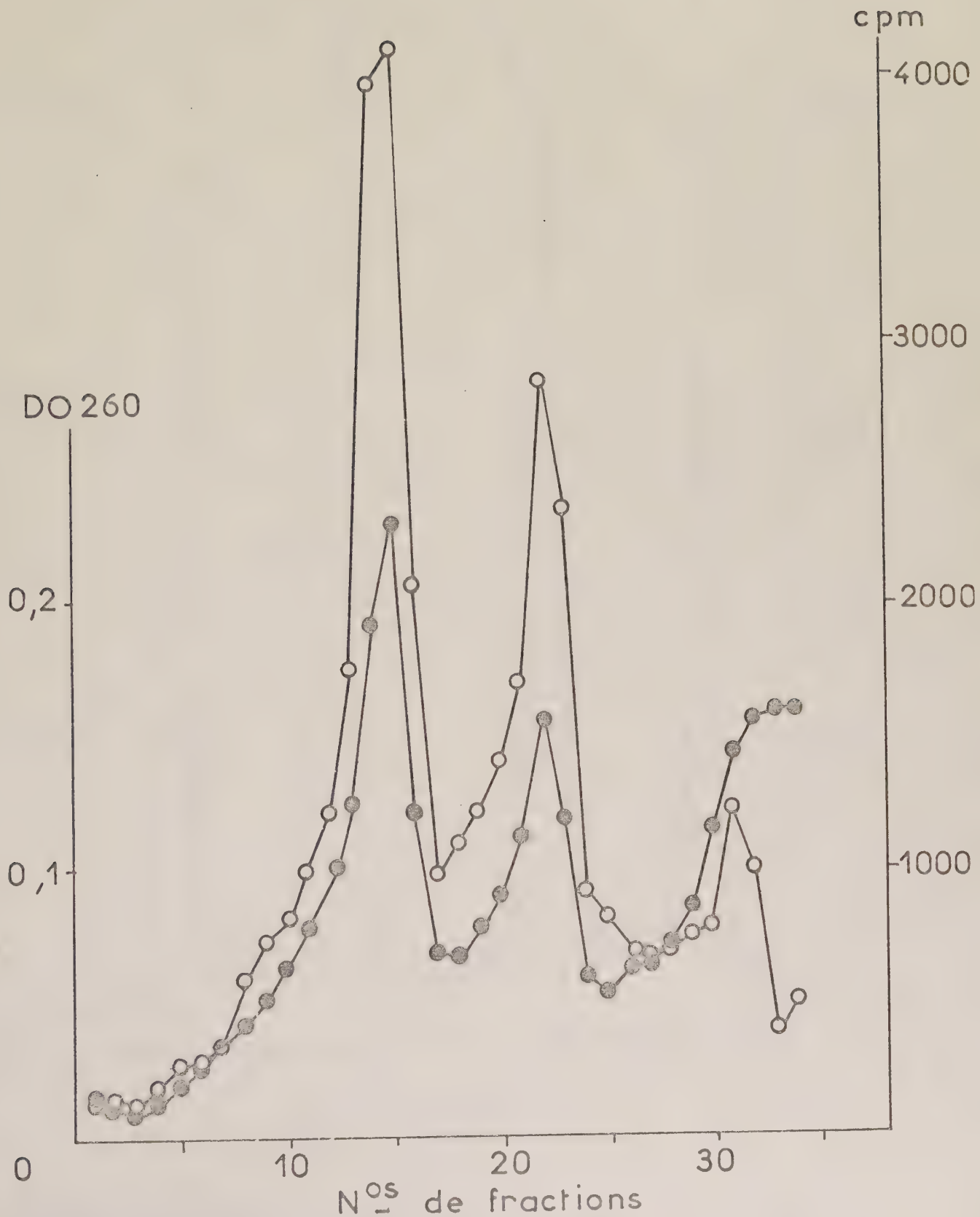


Figure 19b. ARN extrait des femell . bb^{P2}/bb^{P2} (mêmes conditions que celles de la figure 19a).

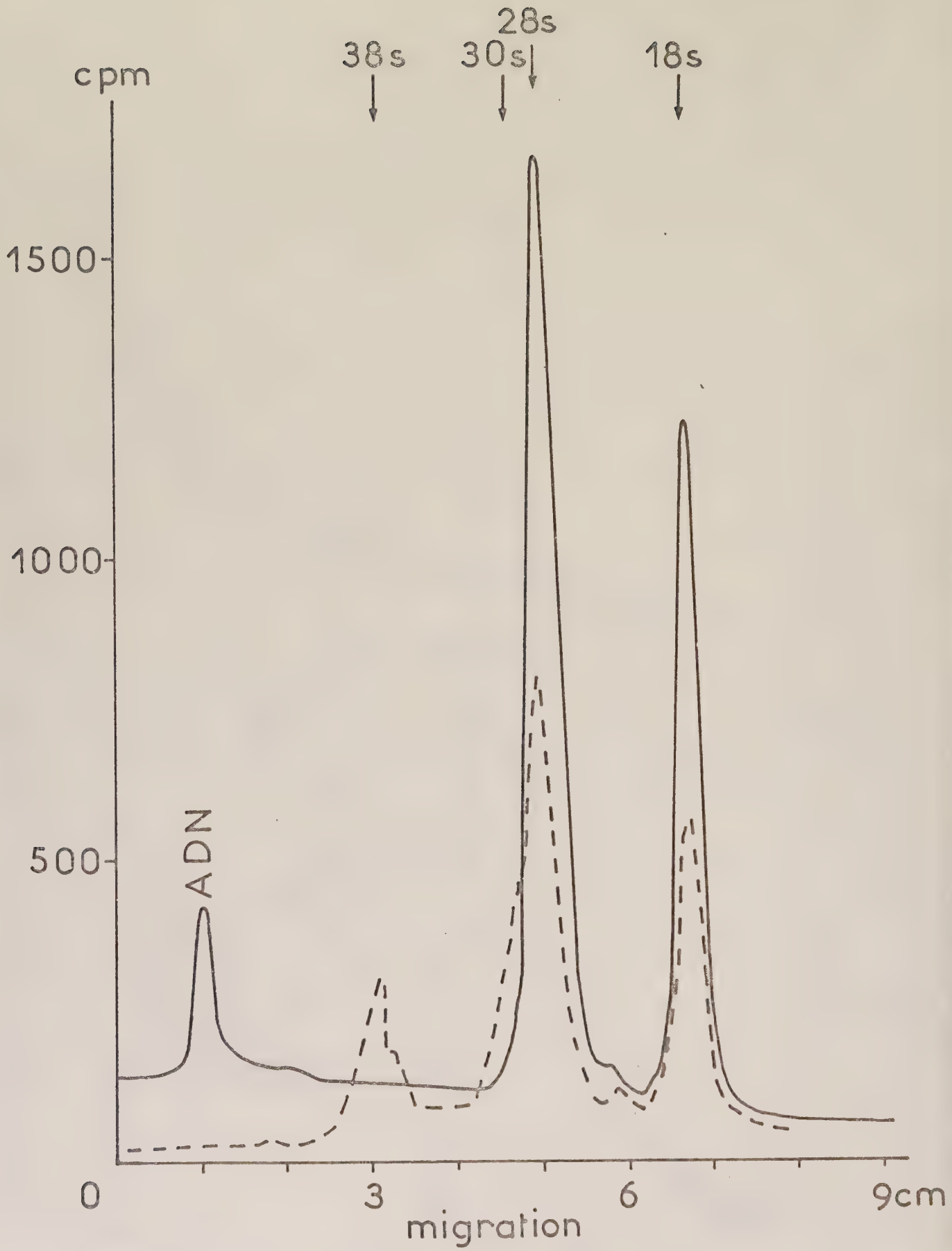


Figure 20a. Séparation électrophorétique de l'ARN extrait de mouches bb^+/bb^+ marquées pendant 30 minutes à l'uridine tritiée (gel de polyacrylamide 2,2 % migration 150 minutes).

——— absorption enregistrée

--------- radioactivité en coups par minute déterminée sur des tranches de 1 mm d'épaisseur

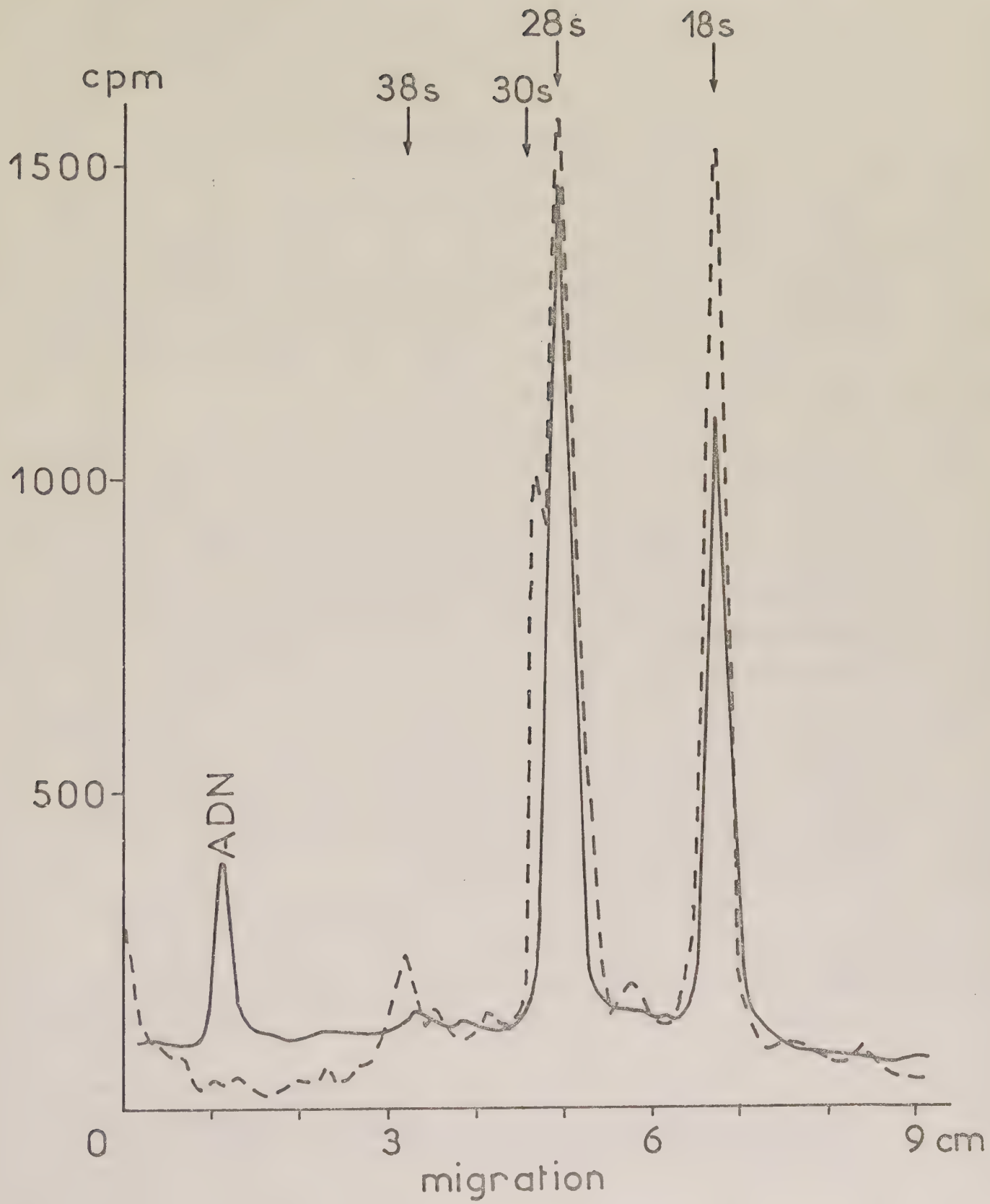


Figure 20b. ARN extrait des femelles bb^{P2}/bb^{P2} (mêmes conditions que celles de la figure 20a).

les mêmes pics 38S, 30S, 28S et 18S, avec cependant un 30S distinct du 28S. Toutefois le rapport entre les radioactivités totales du 28S + 30S et du 18S est de 1,49. Autrement dit on observe un manque de marquage au niveau du 28S + 30S par rapport au 18S.

Différents temps de marquage ont été utilisés (tableau -18-): pour la souche de référence[bb^+], la valeur du rapport 28S + 30S/18S diminue au cours du temps jusqu'à atteindre la valeur 2,0 ce qui correspond à un rapport équimolaire du 28S et 18S. Cette diminution peut s'expliquer par une réduction progressive du précurseur 30S par rapport au 28S. Pour la souche[bb^{P2}]les valeurs sont hétérogènes et n'atteignent pas un rapport équimolaire en 60 minutes de marquage. Ces valeurs sont toujours inférieures à celles de la souche sauvage[bb^+].

Enfin, dans une dernière expérience, nous avons remplacé l'Uridine tritiée par de la méthionine tritiée au niveau du groupement méthyl. L'utilisation de la méthionine tritiée permet de caractériser les différents précurseurs que l'on avait observés après marquage à l'Uridine tritiée (les ARN méthylables sont les ARN ribosomaux, leurs précurseurs et les ARN de transfert), de voir si la méthylation peut s'effectuer correctement chez le bobbed P^2 et de vérifier l'existence d'un manque de marquage du 28S par rapport au 18S.

Les figures -21a- et -21b- montrent le profil de densité optique ainsi que le profil de radioactivité des ARN ribosomaux extraits des mouches[bb^{P2}]et[bb^+]marquées 30 minutes à la méthionine tritiée. Qualitativement les profils de radioactivité sont comparables à ceux obtenus après marquage à l'Uridine tritiée avec toujours un pic 30S bien distinct du 28S chez la souche bb^{P2}.

Quantitativement, le marquage des espèces 28S + 30S par rapport à 18S est inférieur à la normale chez la souche bb^{P2}. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus précédemment en montrant que même s'il y a un déficit de méthylation dans la souche bb^{P2}, celui-ci ne doit pas être important.

En résumé, les deux techniques de marquage nous ont permis de mettre en évidence qu'après des temps courts d'incorporation, il existe chez le mutant un excès de 30S par rapport au 28S et un déficit de 30 + 28S par rapport au 18S.

T A B L E A U -18-

Rapport des radioactivités totales (30S + 28S) / 18S. Les ARN sont marqués à l'uridine-5-^{3}H et caractérisés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Temps d'incubation	(30S + 28S)/ 18S	
	bb^{+}/bb^{+}	bb^{p2}/bb^{p2}
20 min.	2,3	1,87
	2,23*	1,94*
30 min.	2,19	1,94
45 min.	2,05	1,84
60 min.	2,01	1,65

*Valeurs obtenues dans une seconde expérience.

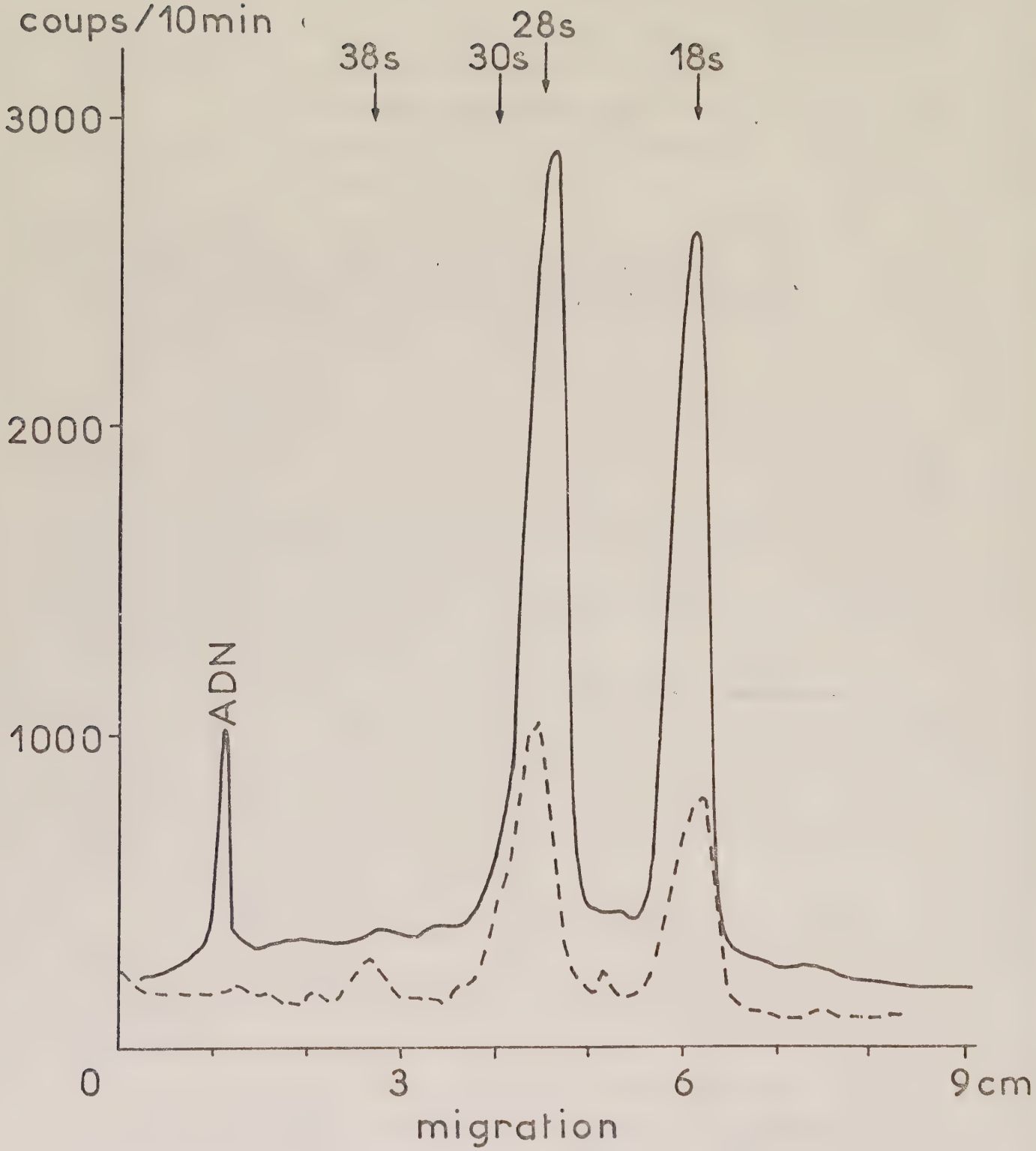


Figure 21a. Séparation électrophorétique de l'ARN extrait des mouches bb^+/bb^+ marquées pendant 30 minutes à la méthionine tritiée (gel de polyacrylamide 2,2 %, migration 3 heures).
——— absorption enregistrée à 260 nm.
--------- radioactivité en coups par 10 minutes.

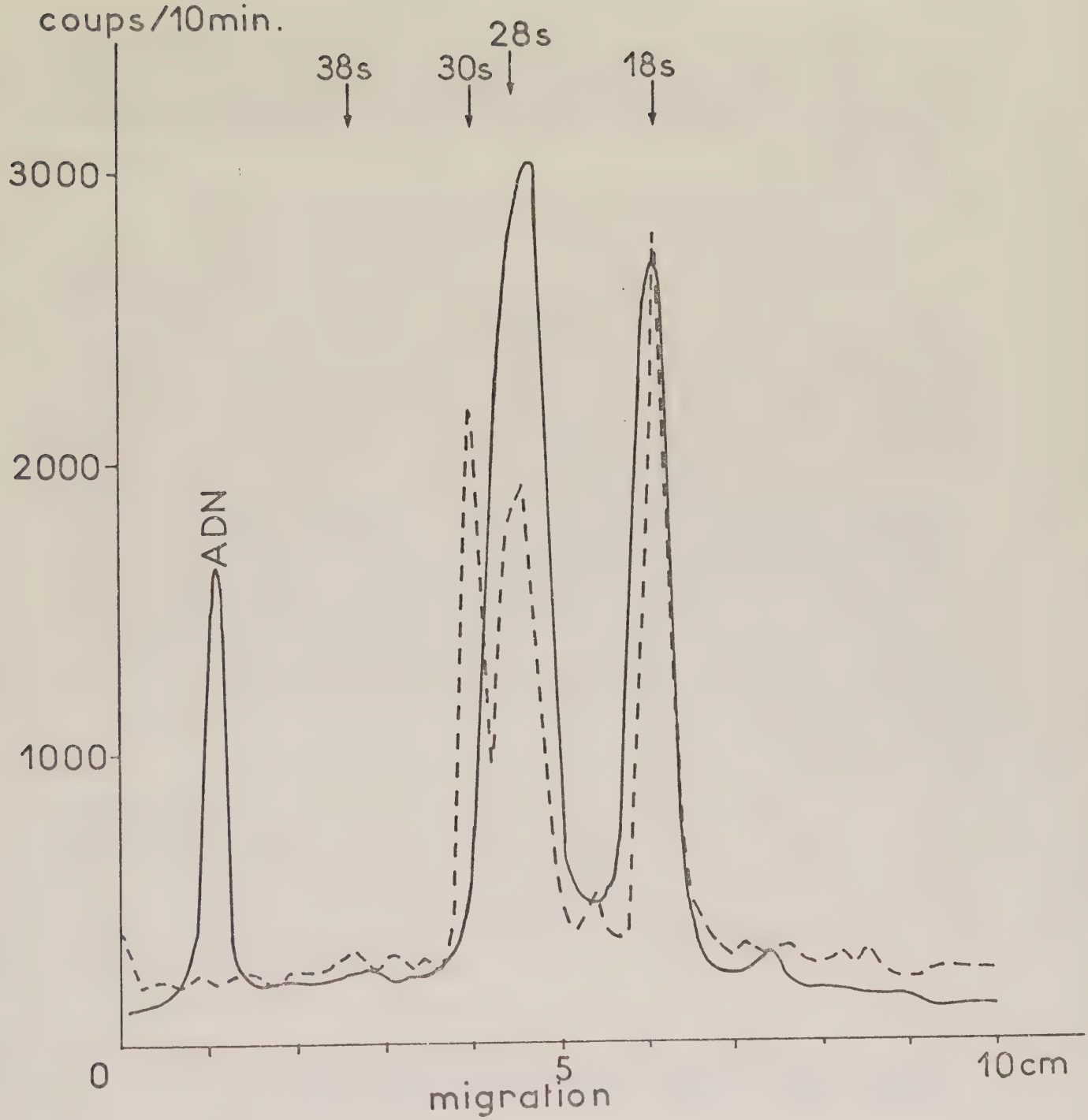


Figure 21b. ARN extrait de femelles bb^{P2}/bb^{P2} (mêmes conditions que celles de la figure 21a).

CHAPITRE V - SYNTHESE PROTEIQUE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES RIBOSOMES EN PARTICULIER DE LEUR CAPACITE DE TRADUCTION DANS UN SYSTEME ACELLULAIRE

Point de rencontre des différents éléments qui interviennent dans la machinerie de la synthèse protéique, les ribosomes jouent un rôle capital dans la traduction de l'ARN messager. On interprète le phénotype bobbed, comme étant dû à une diminution globale des synthèses protéiques résultant d'un manque de ribosomes. Or, nous venons de voir que le mutant bb^{P2} synthétise au moins autant d'ARNr que la souche sauvage. On peut donc se demander si dans le cas de ce mutant, les synthèses protéiques sont effectivement réduites. Si tel est le cas, cette réduction de synthèse ne serait-elle pas dûe à une modification dans la séquence de l'une ou l'autre espèce d'ARNr rendant les ribosomes moins fonctionnels. Il était donc important d'étudier la synthèse protéique chez le mutant bb^{P2} et de la comparer à celle de la souche de référence bb^{+}. Cette étude comprend trois parties :

- Etude de la synthèse des protéines globales soit dans des ovaires incubés *in vitro* soit *in vivo* dans l'animal entier.

- Répartition des polysomes et des monosomes sur un gradient de saccharose 10 % - 40 %.

- Mesure de l'activité des ribosomes dans un système acellulaire utilisant comme messager l'acide polyuridylique (poly U)

a) Effets de la mutation bb^{P2} sur la synthèse des protéines globales.

Nous avons examiné la synthèse protéique, en suivant l'incorporation de la leucine ^{14}C par rapport à l'uridine ^{3}H dans la souche bb^{P2} et la souche de référence bb^{+}.

α) Incorporation de la leucine ^{14}C et de l'uridine-5-^{3}H *in vitro* :

Dans cette expérience, nous avons incubé à 25°C et pendant des temps variables, les ovaires extraits de mouches âgées de 7 jours, dans une solution physiologique "Ringer" contenant de la leucine ^{14}C et de l'uridine-5-^{3}H.

Comme le montre le tableau -19-, le rapport $^{3}H/^{14}C$ est différent pour les deux souches. Quel que soit le temps de marquage utilisé, il est environ deux fois plus élevé pour la souche bb^{P2}.

La valeur élevée du rapport $^{3}H/^{14}C$ chez la souche bb^{P2} peut s'interpréter soit par un excès de synthèse des ARN, soit par une réduction de synthèse des protéines. Or nous venons de voir (tableau -14-) que les ovaires bb^{P2} extraits de mouches âgées de 7 jours synthétisent plus d'ARNr que des ovaires bb^{+} extraits de mouches d'âge comparable. Cette expérience ne permet donc pas de mettre en évidence une baisse des synthèses protéiques. Par contre, ces résultats montrent clairement que la synthèse excédentaire d'ARNr constatée chez le mutant bb^{P2} n'a pas entraîné une augmentation des synthèses protéiques.

β) Incorporation de la leucine ^{14}C et de l'uridine-5-^{3}H *in vivo* :

Dans cette expérience, nous avons utilisé des mouches âgées de 16 jours. Comme nous l'avons déjà vu, le taux de synthèse des ARNr à cet âge est le même pour les deux souches étudiées (tableau -17-).

Les souches sont marquées pendant 2 et 4 heures, dans les mêmes conditions que précédemment, par injection dans leur abdomen d'une solution contenant la leucine ^{14}C et l'uridine-5-^{3}H.

Les résultats obtenus (tableau -20-) montrent :

- Que quel que soit le temps de marquage, le rapport $^{3}H/^{14}C$ reste constant pour bb^{+}.

- Tandis que, la souche bb^{P2} présente un rapport $^{3}H/^{14}C$ qui varie selon le temps de marquage : au temps 2 heures, on observe une valeur du rapport double de celle de bb^{+}, ce qui indique une réduction des synthèses protéiques par rapport à celles des ARN ; au temps 4 heures on observe une valeur du rapport légèrement supérieure à celle de bb^{+}.

TABLEAU -19-

Incorporation de la leucine ^{14}C et de l'uridine ^{3}H dans la fraction TCA précipitable obtenue à partir d'environ 50 ovaires. Ces ovaires sont incubés dans une solution Ringer contenant 30µCi par ml de leucine ^{14}C et 0,5 mCi/ml d'uridine-5-^{3}H.

Temps d'incubation	Génotypes	^{3}H en cpm	^{14}C en cpm	$^{3}H/^{14}C$
15'	♀ bb^{+}/bb^{+}	11 348	1 888	6,01
	♀ bb^{P2}/bb^{P2}	26 172	2 430	10,77
30'	♀ bb^{+}/bb^{+}	23 504	4 554	5,16
	♀ bb^{P2}/bb^{P2}	22 286	2 098	10,62
60'	♀ bb^{+}/bb^{+}	49 085	8 220	5,97
	♀ bb^{P2}/bb^{P2}	63 475	5 576	11,38

T A B L E A U -20-

Incorporation *in vivo* de la leucine ^{14}C et de l'uridine ^{3}H
(mouche âgées de 16 j, incubation à 25°C)

Temps d'incubation	Génotypes	^{3}H en cpm	^{14}C en cpm	$^{3}H/^{14}C$
2 heures	bb^{+}/bb^{+}	13 453	4 905	2,74
	bb^{P2}/bb^{P2}	8 257	1 529	5,40
4 heures	bb^{+}/bb^{+}	6 069	2 160	2,81
	bb^{P2}/bb^{P2}	6 436	1 860	3,46

Le taux de synthèse des ARNr est le même dans les mouches bb^{P2} et bb^{+}, lorsqu'elles sont âgées de 16 jours ; le fait que le rapport $^{3}H/^{14}C$ soit toujours supérieur dans le cas de la mouche bb^{P2} nous indique donc qu'il y aurait une réduction de la synthèse des protéines.

γ) Mise en évidence d'un déficit de synthèse protéique dans la souche bb^{P2} par mesure de la radioactivité spécifique des protéines.

De nouvelles expériences d'incorporation de la leucine ^{14}C *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées, mais au lieu de mesurer l'incorporation globale dans la fraction précipitable au TCA, nous avons déterminé la radioactivité spécifique des protéines extraites du matériel marqué (tableau -21-).

- Les ovaires bb^{P2} extraits de mouches âgées de 16 jours et incubés pendant 30 minutes, montrent une synthèse protéique qui représente 78 % environ de celle des ovaires bb^{+} (tableau -21A-).

- Les expériences de marquage *in vivo* (tableau -21-) indiquent une réduction de la synthèse protéique dans le cas de la souche bb^{P2} comparable à celle constatée *in vitro*. Cette réduction de synthèse est observée au temps de marquage 2 heures quel que soit l'âge des mouches utilisées.

Si le temps de marquage est long (22 heures), nous observons une radioactivité spécifique des protéines sensiblement identique pour les deux souches.

En résumé, les dernières expériences de marquage confirment qu'il y a une réduction des synthèses protéiques dans la souche bb^{P2}. Cette réduction explique bien le phénotype bobbed observé.

b) Répartition des polysomes et monosomes sur gradient de saccharose 10 % - 40 %.

Nous avons comparé la répartition des polysomes et monosomes extraits des mouches bb^{P2} et bb^{+} marquées soit au niveau des ARN soit au niveau des ARN et des protéines :

T A B L E A U -21-

Etude de la synthèse proteïque par marquage à la leucine ^{14}C
(30µCi/ml dans le Ringer)

A = *in vitro* (en incubant les ovaires)

Age des mouches	Temps d'incorporation	cpm/mg de protéines bb^+/bb^+	cpm/mg de protéines bb^{P2}/bb^{P2}	$\frac{cpm(bb^{P2})}{cpm(bb^+)} \times 100$
16 jours	30'	7 127	5 561	78,02

B = *in vivo*

Age des mouches	Temps d'incorporation	cpm/mg de protéines bb^+/bb^+	cpm/mg de protéines bb^{P2}/bb^{P2}	$\frac{cpm(bb^{P2})}{cpm(bb^+)} \times 100$
7 jours	2 h	5 764	4 569	79,27
12 jours	2 h	14 986	12 864	85,80
	22 h	9 117	9 359	102
16 jours	2 h	7 644	6 396	83,67

α) Analyse des polysomes et monosomes extraits de mouches âgées de 16 jours, marquées soit àl'uridine-5-^{3}H soit à l'uridine ^{14}C :

Les figures 22 et 23 montrent les profils obtenus avec un mélange de polyribosomes les uns marqués à l'uridine-5-^{3}H et extraits de bb^{P2}, les autres marqués à l'uridine ^{14}C et extrait de bb^{+}. Les mouches sont marquées pendant 90 minutes (figure 22) et 22 heures (figure 23). On ne voit pas de différence évidente entre les deux profils de radioactivité.

β) Analyse des polysomes extraits de mouches âgées de 16 jours et marquées simultanément à l'uridine-5-^{3}H et à la leucine ^{14}C :

Les figures 24 et 25 montrent les résultats obtenus à partir de mouches marquées pendant 2 heures : les profils de radioactivité et de densité optique sont analogues, qu'il s'agisse de bb^{P2} ou de bb^{+}. Le double marquage fait apparaître en outre, qu'au niveau des polysomes extraits de la souche bb^{P2}, les ARN sont plus fortement marqués que les protéines ; en effet le rapport $\Sigma^{3}H/\Sigma^{14}C$ au niveau des polysomes est 2,47 pour la souche bb^{P2}, et 1,85 pour la souche bb^{+}. Nous retrouvons des valeurs comparables au niveau des monosomes soit 2,26 pour bb^{P2} et 1,74 pour bb^{+}.

Ces résultats montrent clairement que les ARNr nouvellement formés se retrouvent dans les ribosomes engagés dans les synthèses protéiques. De plus, les valeurs du rapport $^{3}H/^{14}C$ sont plus élevées pour la souche bb^{P2} aussi bien au niveau des polysomes qu'au niveau des monosomes. Ceci peut s'interpréter (1) soit par une incorporation plus élevée dans les ARNr du mutant par rapport au sauvage, (2) soit par une synthèse protéique réduite avec une synthèse normale d'ARNr.

Or nous avons vu, qu'à l'âge de 16 jours (tableau -17 -), le mutant bb^{P2} synthétise les ARNr à un rythme comparable à celui du sauvage bb^{+} ; en outre, la comparaison de la radioactivité spécifique des ARNr au niveau des monosomes ne montrent pas de différence significative entre les deux souches (figures 24 et 25). De même, en comparant le marquage en tritium des polysomes par rapport aux monosomes dans ces deux souches, on n'observe pas de différence significative. Le nombre de ribosomes engagés dans la traduction par rapport aux monosomes libres semble être similaire dans les deux souches.

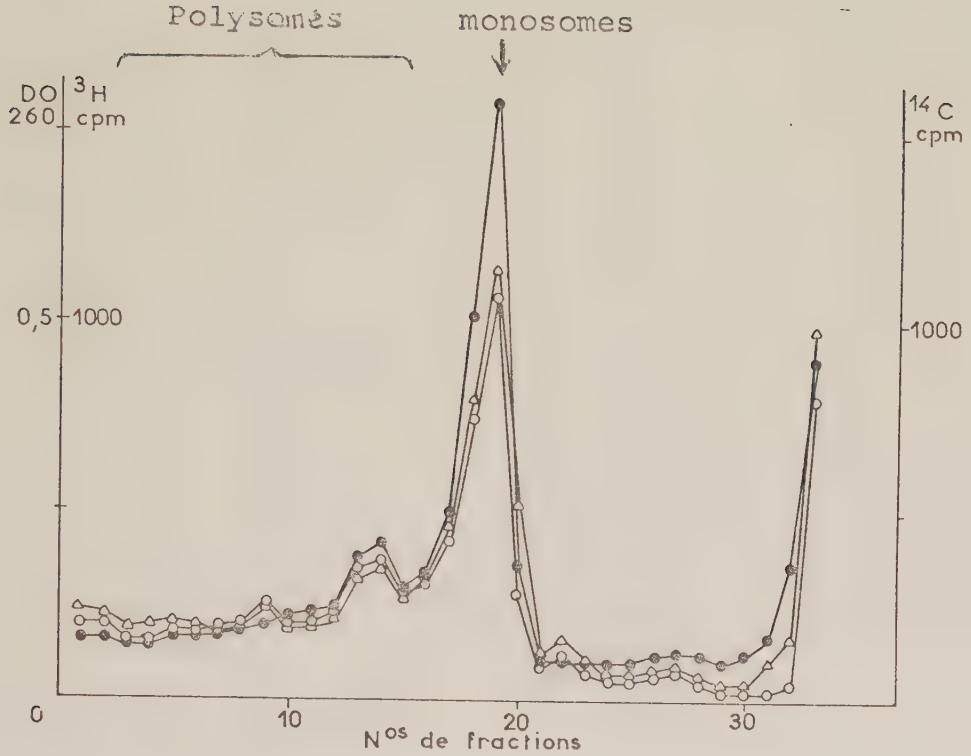


Figure 22. Centrifugation en gradient de saccharose (10 % - 40 %) des ribosomes et polysomes extraits à partir d'un mélange de mouches sauvages et de mouches bb^{P2} marquées respectivement *(in vivo)* pendant 90 minutes à l'uridine ^{14}C et à l'uridine-5^3H. (centrifugation dans le rotor SW41 pendant 1 heure à 400 000trs/minute).

●—● Densité optique o—o Comptage tritium

Δ—Δ Comptage ^{14}C

Figure 23. Centrifugation en gradient de saccharose 10 % - 40 %) des ribosomes et polysomes extraits à partir d'un mélange de mouches sauvages et de mouches bb^{P2} marquées respectivement *(in vivo)* pendant 22 heures à l'uridine ^{14}C et à l'uridine-5-^{3}H. (Rotor SW 41 ; centrifugation pendant 1 heure à 40.000 tours/min.).
●——● Densité optique o——o ^{3}H en c.p.m. Δ——Δ ^{14}C en c.p.m.

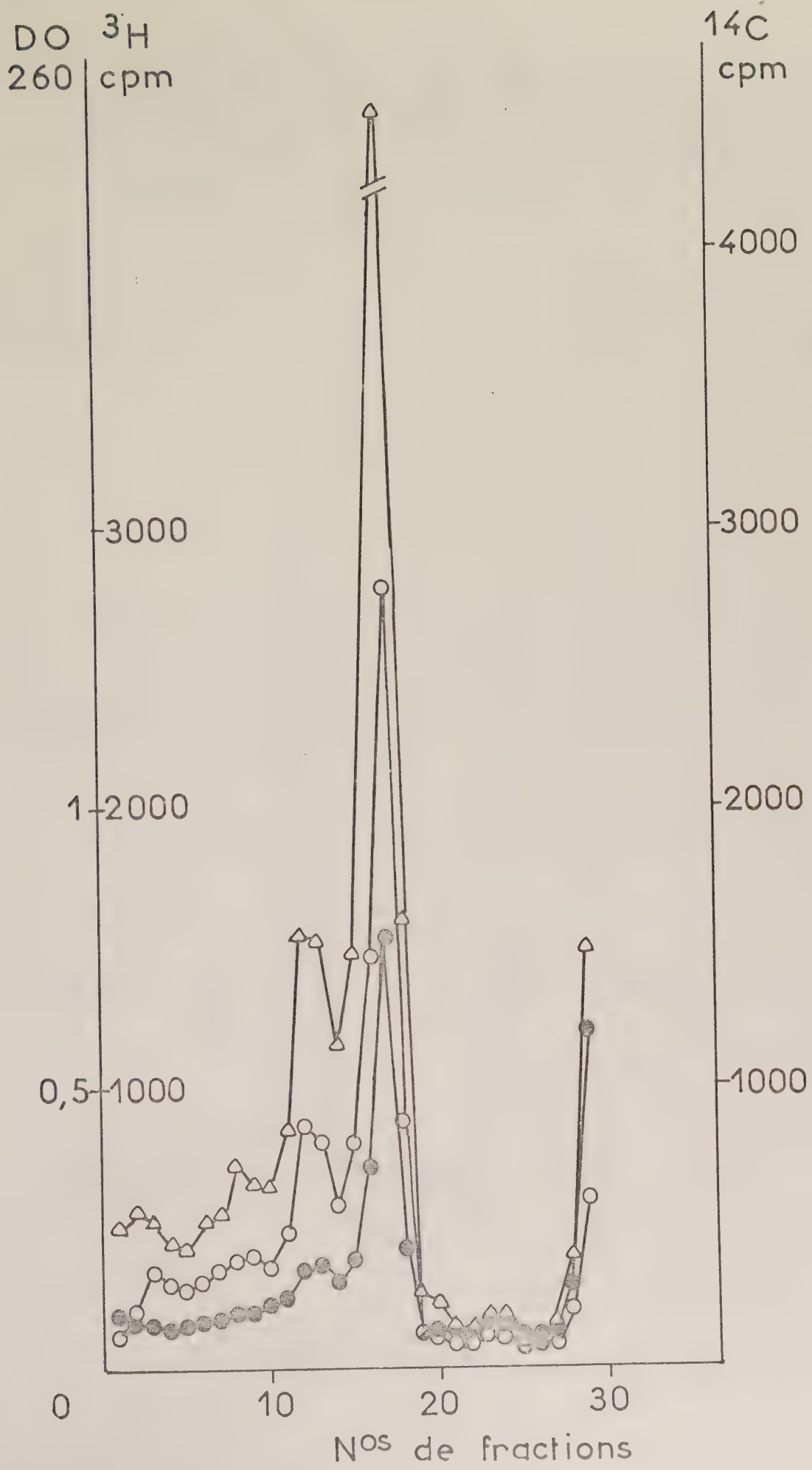

DO 260
^{3}H cpm
^{14}C cpm
4000
3000
2000
1000
3000
2000
1000
1
0,5
0
10
20
30
Nos de fractions

Figure 24. Centrifugation en gradient de saccharose (10-40%) des ribosomes et polysomes extraits à partir des mouches sauvages marquées (*in vivo*) pendant 2 heures à la leucine-^{14}C et à l'uridine-5-^{3}H.
(Rotor SW 41 ; centrifugation 1 heure à 40.000 tours/min.)
●——● Densité optique o——o ^{3}H en c.p.m. Δ——Δ ^{14}C en c.p.m.

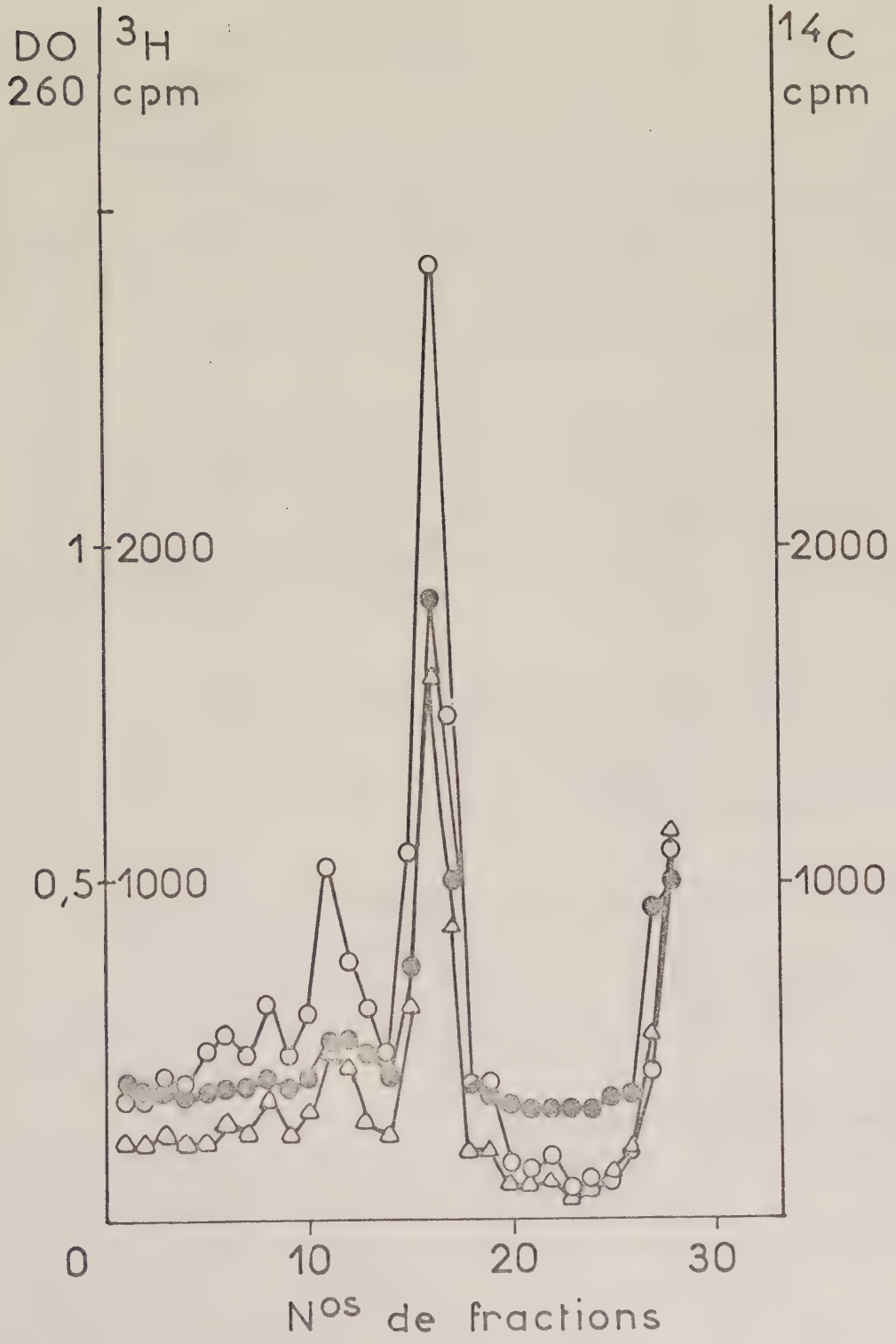
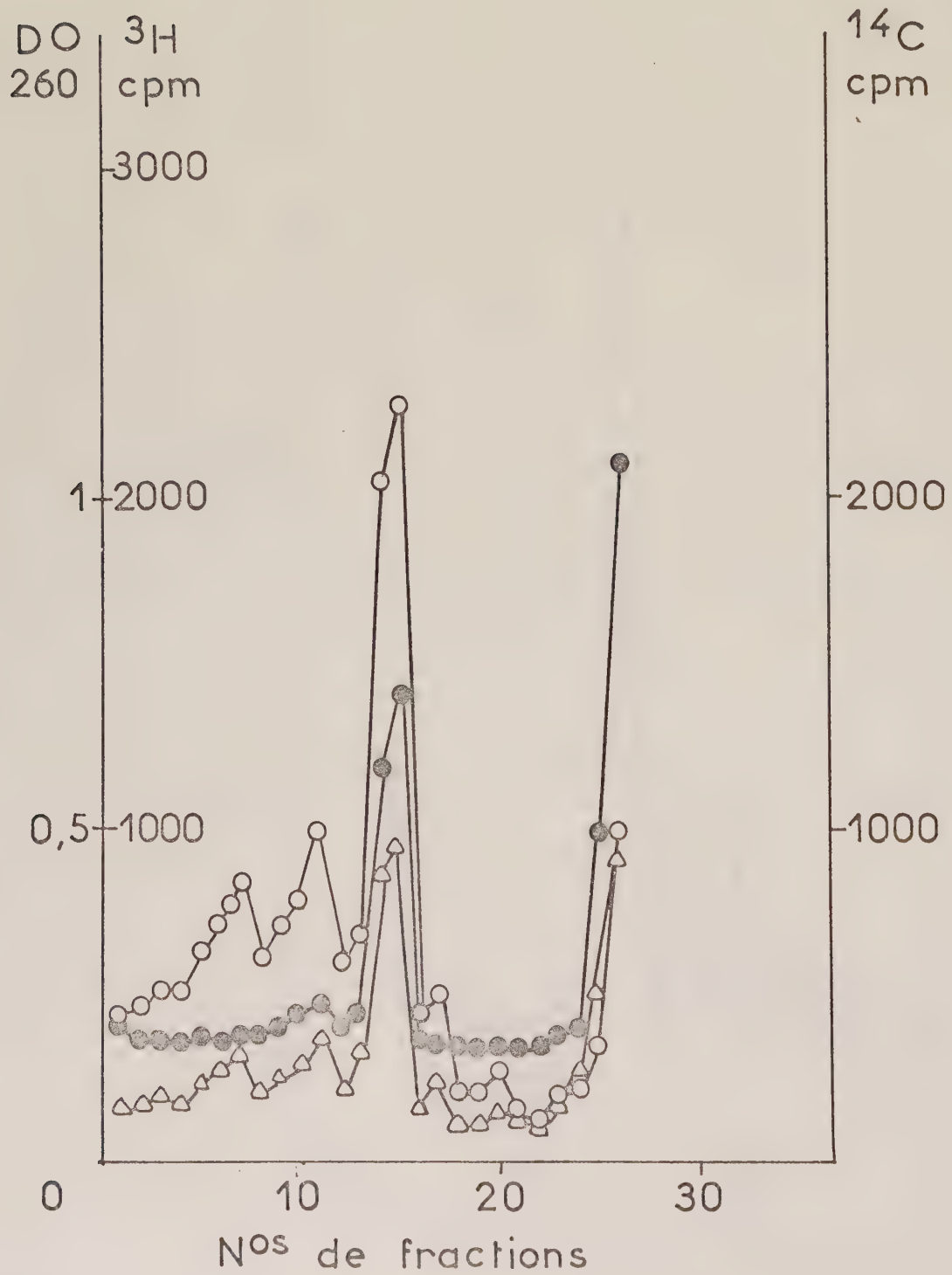


Figure 25. Centrifugation en gradient de saccharose des ribosomes et polysomes extraits à partir des mouches bb^{P2} marquées (*in vivo*) pendant 2 heures à la leucine-^{14}C et à l'uridine-5-^{3}H.
(Mêmes conditions de centrifugation que celles de la figure 24)
●—● Densité optique o—o ^{3}H en c.p.m. Δ—Δ ^{14}C en c.p.m.



Ces arguments sont en accord avec l'hypothèse d'une synthèse protéique réduite en présence d'une synthèse normale d'ARNr ; d'autant plus que nous avons vu, en mesurant la radioactivité spécifique dans les protéines que celle-ci est plus faible chez le mutant bb^{P2} (tableau -21-).

La réduction de cette synthèse protéique peut être due :

- Soit à une dégradation rapide d'une partie des protéines nouvellement formées.

- Soit au fait que le taux de ces synthèses est plus faible.

Les résultats obtenus jusqu'à présent ne permettent pas de choisir avec certitude entre ces deux éventualités.

c) Traduction des ribosomes dans un système acellulaire.

Nous venons de voir que les synthèses protéiques sont réduites chez le mutant bb^{P2}. Cette réduction n'étant pas dûe à un déficit en ribosomes, puisqu'il y a au moins autant d'ARNr marqué par rapport à l'ARNr total au niveau des monosomes dans la souche bb^{P2} et dans la souche bb^{+} ; nous avons émis deux hypothèses :

- Dégradation rapide d'une partie des protéines synthétisées pouvant être attribuée à un défaut qualitatif au niveau de l'une des espèces d'ARNr qui entraînerait une ambiguité dans la traduction et donc synthèse d'une fraction de protéines "anormales" dégradables.

- Synthèse ralentie des protéines pouvant être également attribuée à un défaut qualitatif des ARNr.

Il est possible de tester cette seconde hypothèse, en regardant comment fonctionnent les ribosomes extraits de bb^{P2} dans un système de traduction *in vitro*.

Des expériences préliminaires ont été tentées. Des ribosomes extraits de femelles mutantes bb^{P2} d'une part, et de femelles de référence bb^{+} d'autre part, ont été utilisés dans un système de traduction *in vitro* du poly (U). Que le système enzymatique de traduction provienne de la souche bb^{P2} ou de la souche bb^{+}, le résultat est le même : on observe une diminution de l'ordre de 10 % de l'incorporation de la phénylalanine ^{14}C,

Figure 26 : Activité des ribosomes dans un système de traduction in vitro du messager synthétique poly (U) : Le mélange réactionnel (400 µl) décrit dans matériel et méthodes est incubé à 37°C. Le système enzymatique provient de la souche sauvage. La phénylalanine est marquée au ^{14}C. Les ribosomes sont utilisés à la concentration de 4mg/ml. Des aliquotes de 50 µl sont prélevées et précipitées au TCA à chaud. La radioactivité est mesurée sur le matériel TCA précipitable.

Mélange réactionnel complet avec des ribosomes provenant du témoin (bb^+).

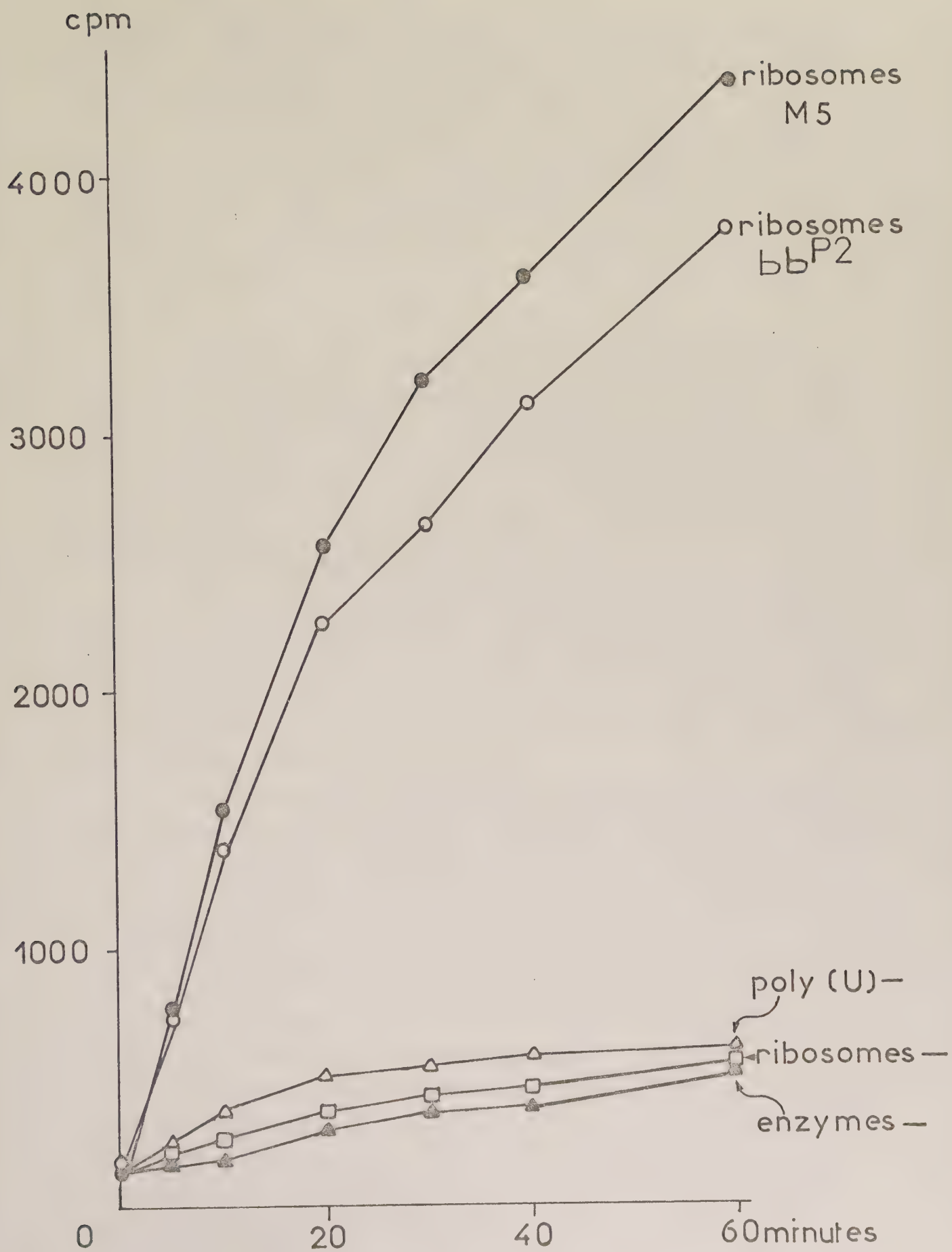
Mélange réactionnel complet avec des ribosomes provenant du mutant bb^{P2}.

Mélange réactionnel sans poly (U).

Mélange réactionnel sans ribosomes

Mélange réactionnel sans enzymes

Figure 26


cpm
4000
3000
2000
1000
ribosomes M5
ribosomes bb P2
poly (U)
ribosomes
enzymes
0
20
40
60 minutes

lorsque les ribosomes sont extraits de la souche bb^{P2}. La figure -26- présente les résultats d'une de ces expériences utilisant comme système enzymatique, les enzymes extraits de la souche sauvage.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'un défaut qualitatif des ARNr. Mais seule l'analyse des séquences des ARNr 28S et 18S du mutant bb^{P2} apporterait l'argument décisif en faveur de notre hypothèse.

DISCUSSION

La mutation bb^{P2} est une mutation présentant tous les critères phénotypiques d'une mutation bobbed très fort ; elle est localisée au même locus que bobbed et elle ne complèmente pas avec d'autres mutations bobbed connues pour correspondre à des déficiences en ADN ribosomal. La souche mutante bb^{P2} possède cependant autant d'ADN ribosomal qu'une souche sauvage et l'hypothèse d'une amplification spécifique de cet ADN au niveau des ovaires a pu être écartée (Fig. -13-).

Nous nous sommes posé la question de savoir si cet ADNr était transcrit. L'étude de l'incorporation *in vitro* et *in vivo* d'un précurseur radioactif des ARN, a montré que la synthèse des ARN ribosomaux 28S et 18S était aussi importante, sinon plus, dans les ovaires des femelles adultes mutantes que dans ceux des femelles de référence. Le mutant est donc capable de synthétiser les ARNr à un taux élevé.

Pour expliquer le phénotype du mutant, on doit donc supposer soit une synthèse anarchique des ARN ribosomaux, soit un défaut qualitatif des ARNr transcrits. Les expériences concernant les ARNr transcrits, ne nous ont pas permis de choisir entre ces deux types d'hypothèses. En effet, la seule anomalie dans les ARNr transcrits par la souche mutante, a été observée dans les expériences de marquage pendant des temps courts (tableau -18-, figures -20a- et -20b-) ; on s'aperçoit que les espèces moléculaires 30S et 28S sont déficitaires par rapport à l'espèce 18S et que l'espèce 28S est déficitaire par rapport au 30S.

On pourrait rendre compte du déficit du 30-28S par rapport au 18S en supposant que chez le mutant bb^{P2}, une modification de la structure nucléolaire rend plus difficile l'extraction des ARN localisés à l'intérieur des nucléoles. Le déséquilibre apparent du 28S et du 18S s'expliquerait alors en admettant chez la Drosophile, comme chez les cellules HeLa (PENMAN 1966), *Tetrahymena pyriformis* (KUMAR 1970) et la

levure (SILLEVIS et coll. 1972) le 28S reste plus longtemps sous forme de précurseur et migre plus tardivement dans le cytoplasme que le 18S. Cependant, la quantité élevée de 30S trouvée dans les extraits va à l'encontre de cette hypothèse.

Une autre hypothèse rendant compte de ce déséquilibre entre 28S et 18S, serait qu'au cours de la maturation des précurseurs ou immédiatement après, une partie des espèces 30S ou 28S est dégradée. Cette dégradation pourrait avoir pour origine deux causes :

a) Soit quantitative : elle serait le résultat d'un excès de synthèse du précurseur 38S aboutissant finalement à un "turn over" plus rapide des ARN ribosomaux, la dégradation du 28S précédant celle du 18S.

b) Soit qualitative : elle s'expliquerait par un défaut de séquence rendant le 30S-28S plus accessibles aux enzymes de dégradation.

Pour choisir entre ces hypothèses, il aurait fallu mesurer le "turn over" des ARN ribosomaux, mais nous nous sommes heurtés à des difficultés techniques : *in vitro* la maturation des précurseurs ne s'effectue que très mal, et *in vivo*, il est difficile de faire des chasses des produits radioactifs.

En revanche des conclusions plus nettes ont été tirées des expériences concernant la synthèse des protéines, le fonctionnement des ribosomes *in vivo* et leur capacité d'incorporer la phénylalanine dans un système acellulaire de traduction de poly (U). En effet nous avons nettement montré que les synthèses protéiques sont réduites dans la souche bb^{P2} (tableaux -20- et -21-). En outre nous avons observé sur gradient de saccharose (Figures -24- et -25-) qu'au niveau des polysomes et des monosomes extraits de bb^{P2}, les ARN sont plus marqués que les protéines, en effet les valeurs du rapport $^{3}H/^{14}C$ sont plus élevées pour la souche bb^{P2}. Ces expériences montrent que chez le mutant bb^{P2}, il y a un déficit de synthèse protéique.

Enfin, pour tester l'efficacité de traduction des ribosomes, nous avons tenté d'observer l'incorporation de la phénylalanine ^{14}C dans un système de traduction *in vitro*, les résultats obtenus montrent une réduction de la capacité de traduction des ribosomes bb^{P2} d'environ 10 %. Des expériences du même genre, en utilisant des messagers extraits du bactériophage T_4 ont été tentées : on n'a observé aucune incorporation pour les deux types de ribosomes.

L'ensemble des résultats obtenus avec ce mutant nous conduit à penser que le défaut des ARNr de ce mutant serait un défaut qualitatif ; dans ce cas, ce doit être un défaut de séquence n'affectant qu'un petit nombre de bases. En effet les ARNr 28S et 18S extraits du mutant donnent des profils comparables à ceux obtenus avec les ARNr extraits de la souche sauvage après chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr, centrifugation sur gradient de saccharose ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Il faut noter en outre, que les ARNr 28S et 18S du mutant bb^{P2}, mis en compétition pour l'hybridation à l'ADN extrait des mouches bb^{+}, avec les ARNr radioactifs et extraits de cette dernière souche bb^{+}, inhibent l'hybridation ADN-ARNr sauvages. L'efficacité de cette compétition est totale. Ces techniques ne permettent de détecter qu'une modification importante des gènes ribosomaux, des changements quantitativement mineurs peuvent passer inaperçus. Il est évident que la seule preuve irréfutable de ce que nous avançons ne pourra être obtenue que par l'étude des séquences. Néanmoins, nous pensons pouvoir, d'ores et déjà, nous poser la question de savoir comment un événement mutationnel unique peut entraîner une modification qualitative des ARNr transcrits sur une centaine de cistrons en tandem ?

Deux interprétations au moins peuvent être envisagées pour rendre compte d'un défaut de séquence dans les ARNr synthétisés par le mutant bb^{P2} :

a) Il existerait chez la Drosophile, au moins deux types de gènes codant pour le précurseur du 28S et du 18S, dont l'expression serait spécifique soit de types tissulaires, soit de stades particuliers du développement. Dans ce cas, on est amené à invoquer un mécanisme de régulation permettant de contrôler le fonctionnement de ces deux séries de gènes.

La mutation bb^{P2} serait dans la zone régulatrice et conduirait dans le cadre de cette hypothèse, à une transcription continue d'une série de gènes qui normalement ne fonctionneraient plus à partir d'un certain stade. On se trouverait donc en présence de deux types d'ARNr chez la mouche adulte bb^{P2}/bb^{P2}, alors que chez le sauvage ne serait présent qu'un seul type d'ARNr.

α) Les arguments en faveur de cette hypothèse tirent leur origine d'expériences montrant une hétérogénéité des ARN ribosomaux dans le cas des bactéries et de quelques eucaryotes :

- Gènes ribosomaux 5S : Chez *Escherichia coli*, l'étude systématique de l'ARNr 5S dans différentes souches, a révélé l'existence

d'une variabilité dans les séquences (JARRY et ROSSET 1971).

Chez les amphibiens, la structure primaire de l'ARNr 5S a été bien établie pour l'espèce *Xenopus laevis* (WEGNEZ et coll. 1972). On a pu mettre en évidence une différence entre la séquence des ARNr 5S de l'oocyte et ceux des cellules somatiques. Il existe donc au moins deux classes de gènes 5S chez *Xenopus laevis*. Les uns s'expriment dans les oocytes, et les autres s'expriment aussi bien dans les oocytes que dans les cellules somatiques.

- Gène ribosomaux 28S et 18S : WELLAUER et coll. 1974 ont montré que chez *Xenopus laevis*, l'espaceur des gènes 28S et 18S est de longueur variable. Ceci a été mis en évidence par la formation de boucles de délétions dans les hétéroduplexes formés en hybridant des brins complémentaires de tailles différentes.

KEN HIGASHI et coll. (1970) ont remarqué chez le rat, que les ARNr 28S et 18S extraits du foie de l'adulte, du foie de l'embryon et des tumeurs hépatiques (tumeur AH 130) ont une composition en bases assez différente : les ARNr du foie de l'embryon diffèrent de ceux du foie de l'adulte ; cependant les auteurs observent une similarité des ARNr du tissu embryonnaire et du tissu tumoral. Par ailleurs, HASHIMOTO et coll. (1972) mettent en évidence l'existence d'une différence de séquences entre les ARNr 28S et 18S du foie et ceux de l'hépatome MH 134 de la souche C_3H/He de souris.

Chez les plantes, GIERSON et coll. (1972) ont signalé une différence dans la taille du précurseur commun des ARNr 28S et 18S entre les racines et les feuilles de *Phaseolus aureus*.

β) Arguments allant à l'encontre de cette interprétation :

- La variabilité des ARNr n'a jamais été signalée chez les insectes.

- Chez les organismes où une hétérogénéité des ARNr a été observée, la signification physiologique de celle-ci n'est pas encore claire.

- En outre, l'hypothèse d'une variabilité des ARNr chez la Drosophile implique l'existence d'au moins deux types de mutations bobbed

déficientes en ADNr touchant l'une ou l'autre des deux séries de gènes : on s'attend peut être à des phénotypes assez différents. Or toutes les mutations bobbed connues pour être déficientes en ADNr présentent le même phénotype et ceci est en relation étroite avec la taille de la déficience. D'autre part des délétions de la partie proximale et de la partie distale du locus bobbed conduisant au même phénotype ne complémentent pas entre elles mais elles présentent un effet additif au même titre que les déficiences portant sur une même partie du locus (SHALET 1969).

b) Il existerait un défaut de séquence au niveau des gènes de structure des ARNr 28S et 18S chez le mutant bb^{P2} :

L'hypothèse du maître et des esclaves (CALLAN 1967 ; WHITEHOUSE 1967) pourrait expliquer comment ce défaut a pu se répercuter sur la majorité des cistrons. Elle suppose que l'unité capable de muter et de se recombiner est un gène unique -le maître-. Afin de maintenir une identité stricte du maître et des esclaves, CALLAN suppose qu'à chaque génération une correction des esclaves sur le maître se produit. Ce modèle rend compte du maintien de l'homogénéité des séquences redondantes. Si une mutation intervient au niveau du maître, par le mécanisme de correction, celle-ci se répercute dans les esclaves.

Ce modèle peut être utilisé pour expliquer la mutation bb^{P2} : nous pouvons supposer qu'il existe un ou plusieurs "maîtres" dans la suite des gènes codant pour les ARNr 28S et 18S. Chaque maître gouverne une série d'esclaves.

- Dans le cas simple d'un seul "maître" : ce modèle suppose que tous les esclaves sont mutés et que les ARNr 28S ou 18S produits par le mutant présentent tous les défauts du maître.

- Dans le cas où il existe deux ou plusieurs "maîtres" : seule la série des esclaves gouvernés par le gène muté sera à son tour mutée. On aura donc deux types d'ARNr 28S et 18S. Les uns normaux, les autres avec un défaut de séquence. Ce défaut n'étant pas important, une partie au moins des ARNr qui le portent formerait des ribosomes, toutefois moins actifs dans la synthèse protéique.

Les deux interprétations que nous venons d'envisager, rendent compte de la mutation bb^{P2}. Comme nous venons de le voir, il est encore difficile de faire un choix parmi elles et il n'est pas exclu que d'autres

interprétations puissent également rendre compte de tous les résultats expérimentaux obtenus jusqu'à présent.

Deux projets d'expériences apportent peut être d'autres renseignements sur la mutation bb^{P2}.

- Si l'étude de la séquence des ARNr 28S et 18S du mutant bb^{P2} ne peut être envisagée, nous pouvons par contre tenter d'étudier le "fingerprint" de ces ARNr après digestion par des ribonucléases spécifiques. Pour cette étude on se heurte à plusieurs difficultés, et en particulier la léthalité du mutant bb^{P2} à l'état homozygote (95 %) rend difficile le marquage des ARNr. On peut toutefois tenter de marquer les ARNr dans des individus hétérozygotes bb^{P2}/bb^{+} et de voir s'il existe une différence entre les plaques électrophorétiques des ARNr 28S et 18S extraits de l'hétérozygote et ceux extraits de l'homozygote bb^{+}/bb^{+}.

- L'étude des "révertants" de bobbed qui apparaissent dans la descendance de femelles hétérozygotes bb^{P2}/bb^{X} (bb^{X} étant une mutation partiellement déficiente en ADNr). La mutation bb^{P2} présente l'avantage d'avoir été induite sur un chromosome inversé M-5 où le locus bobbed se trouve dans la région euchromatique, dans laquelle la recombinaison méiotique est possible. On peut espérer que les révertants qui apparaissent tirent leur origine, au moins dans certains cas, de recombinaisons entre bb^{P2} et bb^{X}. Cette étude est actuellement entreprise par A. LENEVEU et N. PRUD'HOMME.

- P A R T I E I I I -

ETUDE DES GENES CODANT POUR LES ARN RIBOSOMAUX DANS DES TISSUS SPECIFIQUES DE LA LARVE ET DANS L'ADULTE ENTIER DES MALES SAUVAGES [bb^+] ET MUTANTS [BOBBED].

Chez *Drosophila melanogaster*, les mutations bobbed caractérisées par une déficience en ADNr, ont la propriété de reverser avec une haute fréquence vers bb^+ quand elles sont placées dans un contexte génétique particulier, chez les mâles de phénotype bobbed fort. Cette réversion est appelée "magnification" (RITOSSA et coll. 1968). Les révertants bb^+ qui apparaissent présentent un niveau d'ADNr plus élevé que celui de la mutation bobbed initiale (RITOSSA et coll. 1971, LOCKER et coll. 1973).

Des croisements qui permettent la mise en évidence de la "magnification" sont décrits dans la figure -27-. Les révertants bb^+ apparaissent dans la descendance des mâles G1 = bb/Ybb^-, appelés mâles "prémagnifiés". Chez ces mâles G1 de phénotype bobbed fort, le niveau d'ADNr se révèle plus élevé que leur phénotype ne le laisserait prévoir. Nous appellerons également, mâles "prémagnifiés" les mâles bb/O (sans chromosome Y) qui proviennent du croisement suivant :

$$♀\ \overline{XX} \quad X \quad ♂\ bb/Ybb^+$$

$$\downarrow$$

$$♀\ \overline{XX}/Ybb^+ \quad \text{et} \quad ♂\ bb/O \quad [\text{bb fort}]$$

Ces mâles présentent une quantité d'ADNr équivalente à celle trouvée chez les mêles bb/Ybb^- (RITOSSA et coll. 1971).

Les mâles "prémagnifiés" rappellent les femelles bb^{P2} (IIème partie de cette thèse) par trois aspects au moins :

- Le phénotype bobbed fort des mouches

- Un niveau d'ADNr élevé, déterminé sur les mouches entières.

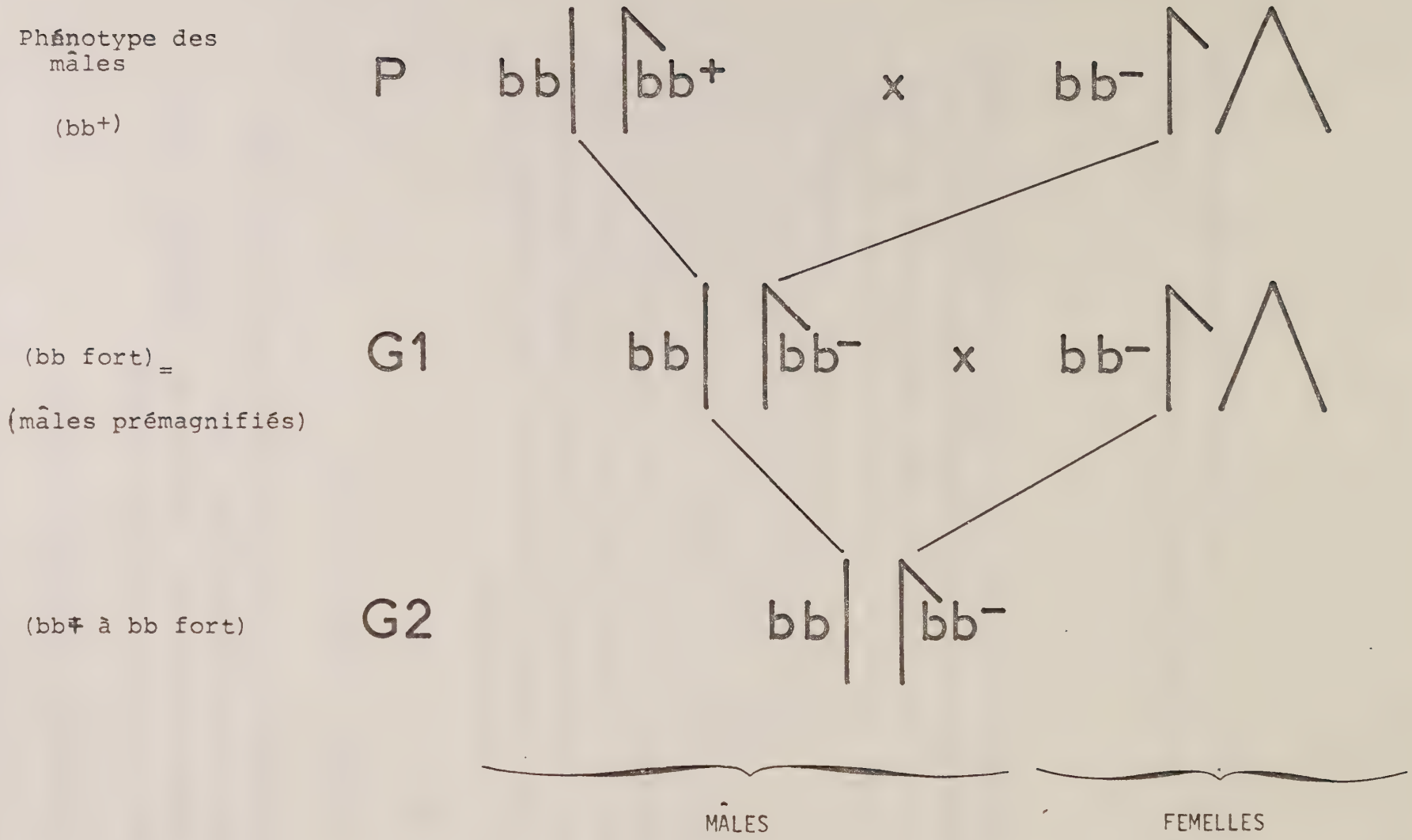


Figure 27. Croisements permettant la mise en évidence de la réversion (magnification)
(Thèse de 3ème cycle de D. LOCKER, Juin 1973)

- Un taux de synthèse des ARNr, mesuré sur les glandes génitales incubées *in vitro*, plus important chez les mâles "prémagnifiés" que chez les mâles de référence bb^+ (RITOSSA et coll. 1971).

Nous avons voulu savoir :

- Si cet ADNr "en excès" était présent dans tous les tissus,

- Et, s'il était transcrit en ARN ribosomal.

Le travail présenté ici comporte donc deux parties :

1° - Quantité d'ADNr dans des tissus polytènes (glandes salivaires), des tissus diploïdes (cerveaux et disques imaginaux), et un mélange des deux types de tissus (mouches entières).

2° - Transcription de cet ADNr dans les glandes salivaires, dans les glandes génitales et dans l'animal entier.

Cette étude biochimique, est indissociable de l'important travail génétique mené par D. LOCKER dans le laboratoire. Elle est donc le résultat d'une étroite collaboration.

A - DETERMINATION DES NIVEAUX D'ADNr DANS LES TISSUS POLYTENES ET DIPLOIDES DE LA LARVE, AINSI QUE CHEZ L'ADULTE ENTIER.

1) Génotypes des mâles

Les mâles utilisés sont indiqués dans le tableau suivant :

Génotype	Phénotype
bb^+/B^SYbb^+	$[bb^+]$
bb^+/Ybb^-	$[bb^+]$
bb^+/O	$[bb^+]$
$In(1)w^{m4}bb/B^SYbb^+$	$[bb^+]$
$In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$	[bb fort]
$In(1)w^{m4}bb/O$	[bb fort]
bb^{P5}/B^SYbb^+	$[bb^+]$
bb^{P5}/Ybb^-	[bb fort]

Les mâles bb^+/O et bb/O, n'ayant pas de chromosome Y ont un seul organisateur nucléolaire dans le chromosome X.

Le chromosome X portant le locus bb^+ provient de la souche Oregon R de Paris. Le mutant bobbed ($In(1)w^{m4}bb$) provient de la collection d'Urbana. Enfin, le mutant bobbed (bb^{P5}) a été obtenu par mutagénèse à l'E.M.S. (Partie II de cette thèse). Ces deux mutants bobbed sont déficients en ADNr ; ils réversent à haute fréquence (LOCKER 1973).

Le chromosome Ybb^- provient de la collection d'Urbana. Il se comporte comme s'il était fonctionnellement déficient en ADNr.

2) Techniques utilisées

Les techniques d'extraction et de purification de l'ADN à partir des glandes salivaires, et des cerveaux, différentes de celles utilisées pour les mouches entières sont décrites au chapitre Matériels et Méthodes.

L'hybridation ADN-ARNr est faite à basse température en présence d'urée 0,8 M. Des expériences préliminaires nous ont montré que dans ces conditions :

- Un temps d'incubation de 16 heures à 40°C est largement suffisant pour atteindre le plateau de saturation.

- Une concentration de 2 µgrs d'ARNr radioactif suffit pour saturer les sites complémentaires contenus dans 2 à 3 µgrs d'ADN extrait des mouches sauvages.

- Le témoin, c'est à dire des filtres vierges incubés dans les mêmes conditions que les filtres chargés avec de l'ADN a une radioactivité inférieure à 1 % de celle de l'échantillon. L'ARNr radioactif utilisé dans toutes nos expériences, provient de cellules en culture ; sa radioactivité spécifique est de 180 000 à 375 000 cpm par µgr.

3) Résultats (Tableau -22-).

D'après les résultats, il est possible de connaître pour chaque locus bobbed, la quantité d'ADNr. Il faut toutefois remarquer, que les

TABLEAU -22-

Estimations des pourcentages d'ADNr obtenus à partir de différentes sources d'ADN total

Sources d'ADN / Génotypes des mâles	Tissus diploïdes (cerveaux + disques imaginaux)	Tissus polytènes (glandes salivaires)	Adultes entiers
bb^+/B^SYbb^+	0,442 ± 0,014	0,085 ± 0,011	0,288 ± 0,008
bb^+/Ybb^-	0,255 ± 0,011	0,066 ± 0,005	0,218 ± 0,018
bb^+/O	0,246 ± 0,020	0,079 ± 0,009	0,196 ± 0,015
$In(1)w^{m4}bb/B^SYbb^+$	0,351 ± 0,015	-	0,234 ± 0,016
$In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$	0,174 ± 0,022	0,060 ± 0,007	0,190 ± 0,005
$In(1)w^{m4}bb/O$	0,157 ± 0,008	0,059 ± 0,014	0,173 ± 0,009
bb^{P5}/B^SYbb^+	0,317 ± 0,010	-	0,200 ± 0,014
bb^{P5}/Ybb^-	0,144 ± 0,013	-	0,155 ± 0,013

valeurs obtenues sont des pourcentages d'ADNr rapportés à l'ADN total. Or l'ADN total varie légèrement selon les génotypes ; ainsi en comparant bb^+/B^SYbb^+ à bb^+/O : dans ce dernier génotype, il manque tout l'ADN correspondant au chromosome Y. Dans un génotype mâle, on estime à 10 % l'ADN contenu dans le chromosome Y (TARTOF 1971). Nous avons donc corrigé les valeurs trouvées pour les génotypes bb^+/O et bb/O pour rapporter l'ADNr à l'ADN total d'un génome mâle normal. Les chiffres présentés dans le tableau -22- tiennent compte de ces corrections. Par contre, nous avons négligé les petites différences telles que la duplication de "Bar" sur le chromosome Y (B^S/Ybb^+) et la déficience d'une partie du bras court du chromosome Ybb^- (COOPER 1959). De même nous avons négligé cette correction pour les tissus polytènes où le chromosome Y étant hétérochromatique est fortement sous répliqué.

Pour un génotype donné, le tableau -22- montre que les quantités d'ADNr, sont significativement différentes dans les tissus diploïdes et les tissus polytènes des larves de 3ème stade, ainsi que dans les mouches adultes.

a) ADNr dans les tissus diploïdes (cerveaux et disques imaginaux)

Les pourcentages d'ADNr dans les tissus diploïdes varient énormément d'un génotype à un autre :

α) Témoins

Les valeurs obtenues, pour chacun des mâles bb^+/O, bb^+/B^SYbb^+ et bb^+/Ybb^- permettent d'estimer les pourcentages d'ADNr correspondant respectivement au locus bb^+ de l'X, de l'B^SY et au chromosome Ybb^- :

- ADNr contenu dans le chromosome X portant bb^+ : il est égal à 0,246 % ($\sigma^{\prime} bb^+/O$, tableau -22-).

- ADNr contenu dans le chromosome B^SYbb^+ : en admettant que le pourcentage d'ADNr, correspondant au locus bb^+ de l'X (0,246 %) na varie pas selon les génotypes, la valeur d'un locus bb^+ sur le chromosome Y déduite des mâles bb^+/B^SYbb^+ est de 0,196 %.

- ADNr contenu dans le chromosome Ybb^-.

A partir des mâles bb^+/O et bb^+/Ybb^-, nous obtenons une valeur pour Ybb^- de 0,009 %. Nous voyons que la présence d'un chromosome Ybb^- n'augmente pas la quantité d'ADNr d'une façon significative. Nous pouvons conclure que ce chromosome est complètement déficient en ADNr, ou si de l'ADNr est présent, il n'est pas détectable (SPEAR 1974). En outre, ce chromosome n'a aucun effet additif ; ceci est en accord avec les résultats d'hybridation ADN-ARNr.

β) Chromosome X correspondant à l'$In(1)w^{m4}bb$

Connaissant la quantité d'ADNr portée par B^SYbb^+ (0,196 %), la valeur obtenue pour la mutation bb ($In(1)w^{m4}bb$) à partir des mâles $In(1)w^{m4}bb/B^SYbb^+$ est de 0,155 %. Cette valeur n'est pas significativement différente de celles déterminées à partir des tissus diploïdes des mouches "prémagnifiées" (0,157 % à partir des mâles $In(1)w^{m4}bb/O$ et 0,165 % à partir des mâles $In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$).

Notons que la valeur estimée pour $In(1)w^{m4}bb$ est assez élevée ; le phénotype bobbed fort des mâles $In(1)\ w^{m4}bb/Ybb^-$ et $In(1)w^{m4}bb/O$ est peut être dû en partie à un effet de position du fait de l'inversion du chromosome (BAKER 1971).

γ) Chromosome X portant bb^{P5}

En appliquant le même type de calcul, nous obtenons pour le locus bb^{P5}, un pourcentage d'ADNr estimé à partir des mâles bb^{P5}/B^SYbb^+, d'environ 0,121 %. A partir des mâles bb^{P5}/Ybb^- la valeur d'ADNr mesurée est de 0,135 %. Les deux valeurs ne sont pas significativement différentes.

En résumé, la mesure des quantités d'ADNr dans les cellules diploïdes a permis de montrer :

- Que le pourcentage d'ADNr varie d'un génotype à un autre.

- Qu'il est proportionnel au nombre d'organisateurs nucléolaires ; l'ADNr des cellules bb^+/O représente presque la moitié des cellules bb^+/Ybb^+.

- Qu'il est fonction de la présence des mutations au locus bobbed. En particulier, on trouve moins d'ADNr dans les cellules bb/Ybb^+ que dans les bb^+/Ybb^+, dans les cellules bb/O que dans les bb^+/O.

- Qu'il n'y a pas d'amplification de l'ADNr dans les cellules bb^+/O, bb^+/Ybb^-, bb/O et bb/Ybb^-.

b) ADNr dans les tissus polytènes (glandes salivaires)

Dans ces tissus, le chromosome Y étant hétérochromatique et pratiquement sous repliqué, aucune correction n'a été faite pour les génotypes bb^+/O et bb/O.

Les résultats présentés dans le tableau -22- montrent :

α) Le pourcentage d'ADNr est nettement plus faible dans les tissus polytènes des larves que dans les tissus diploïdes, ou que dans la mouche adulte. L'ADNr dans ces tissus est donc sous repliqué par rapport aux tissus diploïdes ; ceci est valable pour tous les génotypes étudiés. Ces résultats confirment ceux obtenus par HENNIG et MEER (1971) sur *Drosophila hydei* et SPEAR et GALL (1973) sur *Drosophila melanogaster*

β) Qu'il s'agisse de cellules $[bb^+]$ à deux organisateurs nucléolaires (bb^+/Ybb^+) ou à un seul organisateur nucléolaire (bb^+/O), la quantité d'ADNr est la même et est de l'ordre de 0,07 à 0,08 %. Il y a une "compensation de l'ADNr" dans les glandes salivaires des mâles à un seul organisateur nucléolaire (TARTOF 1971).

γ) Dans le cas des glandes salivaires des mâles $In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$ et $In(1)w^{m4}bb/O$, la quantité d'ADNr est la même et est d'environ 0,06 %. Cette valeur est légèrement plus faible que la valeur moyenne -0,077 %- calculée pour les génotypes bb^+/Ybb^+, bb^+/O et bb^+/Ybb^-. Dans les tissus polytènes, le pourcentage d'ADNr étant faible, il est donc difficile d'avoir une grande précision et on ne peut donc dire si les valeurs 0,060 % et 0,077 % sont différentes ou non.

Cependant, la valeur du rapport (ADNr des cellules diploïdes bb^+/O sur ADNr des cellules diploïdes bb/O) -1,56- est peu différente de celle du rapport (ADNr des glandes salivaires bb^+/O sur ADNr des glandes salivaires bb/O) -1,34-. Le plus vraisemblable serait qu'il y ait une proportionnalité.

Quoiqu'il en soit, nous pouvons dire qu'il n'y a pas un excès d'ADNr dans les tissus polytènes des individus prémagnifiés, par conséquent il n'y a pas d'amplification de l'ADNr dans ces tissus chez ces mâles.

c) ADNr dans les mouches adultes

Pour tous les génotypes bb^+/Ybb^+, bb^+/Ybb^-, $bb^+/0$, $In(1)w^{m4}bb/Ybb^+$ et bb^{P5}/Ybb^+, correspondant à des phénotypes bb^+, le pourcentage d'ADNr dans l'adulte est intermédiaire entre celui des tissus diploïdes et celui des tissus polytènes ; ce qui est normal car dans les mouches adultes, il y a un mélange de tissus polytènes et de tissus diploïdes (ASHBURNER 1970).

La quantité d'ADNr dans les mâles $bb^+/0$ et bb^+/Ybb^- représente environ 75 % de celle déterminée pour les mâles bb^+/Ybb^+, ce qui est en accord avec les résultats de TARTOF (1971, 1973). L'excès d'ADNr observé chez ces mâles $bb^+/0$ s'explique par une compensation au niveau des cellules polytènes.

Par contre, pour les mâles "prémagnifiés" bb/Ybb^- et bb/0 de phénotype bobbed fort, le pourcentage d'ADNr est supérieur ou au moins égal à celui déterminé dans les cellules diploïdes extraites des larves de même génotype. Un mélange de tissus diploïdes et polytènes ayant des quantités d'ADNr égales à celles que nous avons trouvées dans les tissus larvaires, ne peut expliquer les quantités d'ADNr observées dans les adultes.

B - ETUDE DE LA SYNTHESE DES ARNr DANS LES GLANDES SALIVAIRES DE LA LARVE, DANS LES TESTICULES ET DANS L'ADULTE ENTIER.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la quantité d'ADNr dans les glandes salivaires est sensiblement la même chez les mâles bb^+/Ybb^-, $bb^+/0$, bb/Ybb^- et bb/0 ainsi que chez les mâles témoins bb^+/Ybb^+. Dans la mouche entière, le pourcentage d'ADNr est supérieur à la valeur attendue ; en particulier, les mouches bb/Ybb^- et bb/0 présentent un pourcentage d'ADNr supérieur à celui estimé dans les cellules diploïdes des larves.

La question se pose donc de savoir, si cet ADNr en excès a une influence sur le taux de synthèse des ARNr 28S et 18S ? En outre, cette étude nous permettra peut être d'expliquer le phénotype bobbed des mâles "prémagnifiés" et de donner des indications sur le mécanisme de la magnification.

1) Mouches étudiées

♂ bb^+/Ybb^+	$[bb^+]$
♂ bb^+/Ybb^-	$[bb^+]$
♂ $bb^+/0$	$[bb^+]$
♂ $In(1)w^{m4}bb/Ybb^+$	$[bb^+]$
♂ $In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$	[bb fort]
♂ $In(1)w^{m4}bb/0$	[bb fort]

2) Résultats

Nous avons étudié le taux de synthèse des ARNr d'une part *in vitro* : en incubant dans une solution physiologique contenant de l'uridine-5-^{3}H, soit les glandes salivaires extraites des larves de troisième stade, soit les glandes génitales extraites des adultes ; d'autre part *in vivo* en injectant de l'uridine-5-^{3}H dans la cavité abdominale des mouches et en étudiant les ADNr dans la mouche entière.

a) Synthèse des ARNr *in vitro*

Les mêmes techniques d'incubation, et, de purification des ARN, ont été utilisées, qu'il s'agisse des glandes salivaires ou des testicules : incubation pendant une heure à 25°C dans une solution Ringer contenant de l'uridine-5-^{3}H (0,5 mCi/ml), puis purification des ARN par chromatographie sur albumine méthylée Kieselguhr.

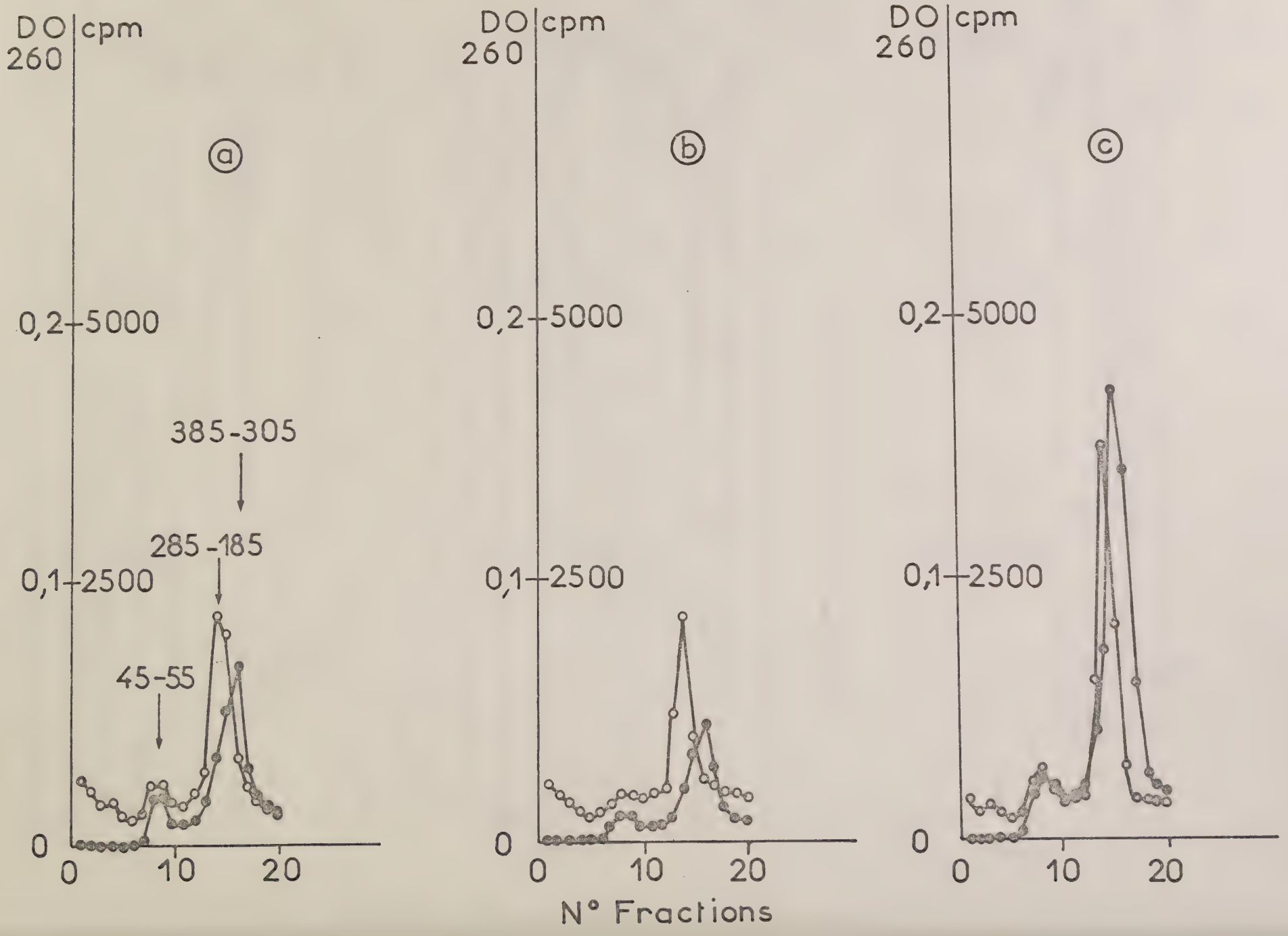
α) Synthèse des ARNr dans les glandes salivaires

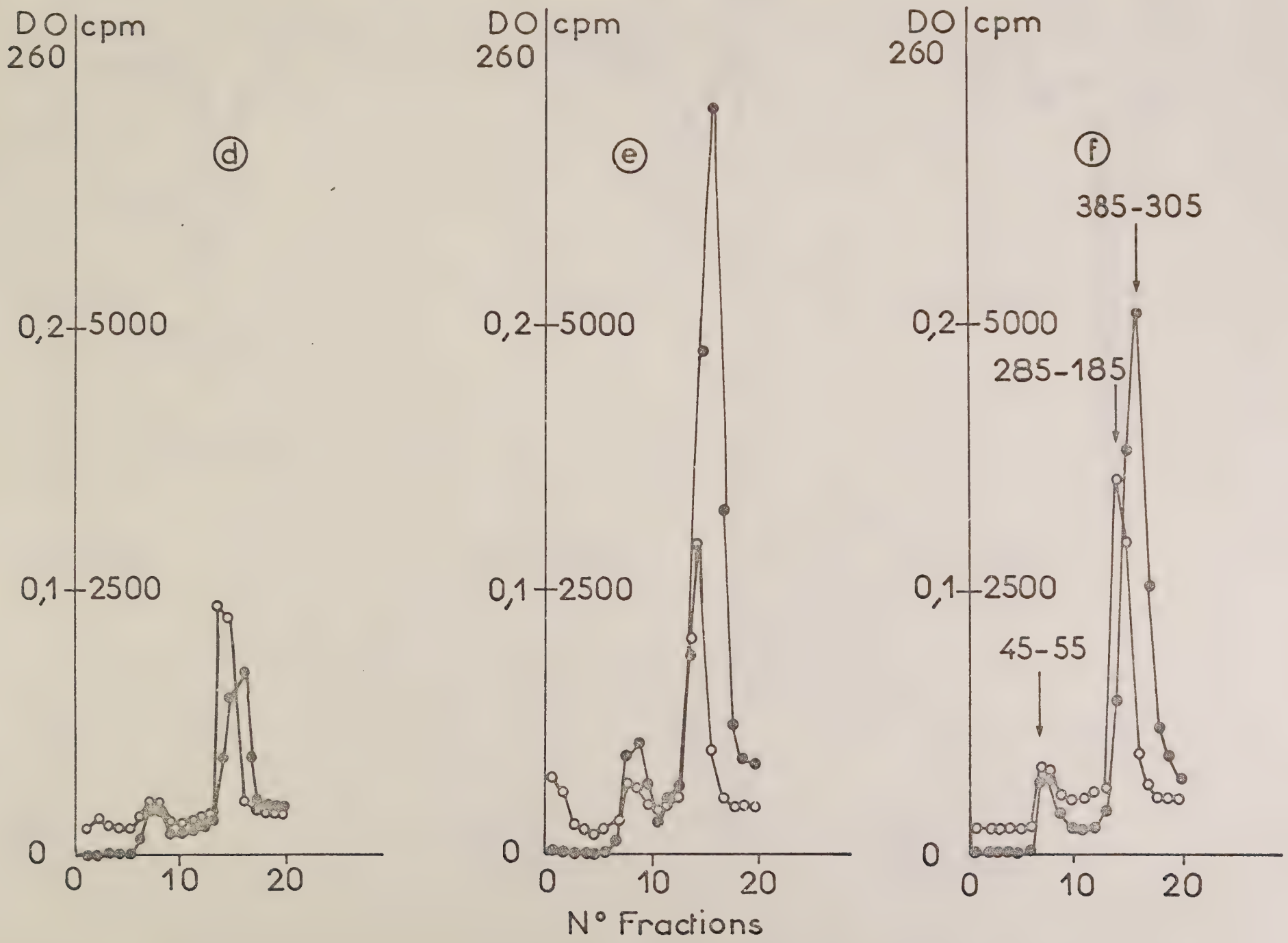
Les figures (-27a,b,c,d,e,f-) montrent les profils de densité optique et de radioactivité des ARN extraits des glandes salivaires. Qu'il s'agisse de profil de densité optique ou de radioactivité, on

Figure 27. Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr de l'ARN extrait des glandes salivaires (incubées 1 heure à 25°C dans l'uridine-5-^{3}H).

o——o Densité optique à 260 nm ●——● Radioactivité

(a) ♂ bb^{+}/Ybb^{+}; (b) ♂ bb^{+}/Ybb^{-}; (c) ♂ bb^{+}/O ; (d) ♂ bb/Ybb^{+}
(e) ♂ bb/Ybb^{-} ; (f) ♂ bb/O.


DO
260
cpm
0,2
5000
0,1
2500
0
385-305
285-185
45-55
a
b
c
0
10
20
N° Fractions


DO
cpm
260
0,2
5000
0,1
2500
0
0
10
20
d
e
f
385-305
285-185
45-55
N° Fractions

n'observe pas de différence qualitative entre les différents génotypes étudiés. On remarque à nouveau que les ARNr synthétisés *in vitro* ne se découpent pas en ARNr 28S et 18S (au niveau des ARNr, il y a un net décalage entre les pics de radioactivité et de densité optique).

En revanche on constate de nettes différences quantitatives : les cellules polytènes des mâles bb/Ybb$^-$ et bb/O ainsi que celles des mâles bb$^+$/O synthétisent plus de précurseurs d'ARNr que les mâles bb$^+$/Ybb$^+$, bb$^+$/Ybb$^-$ et bb/Ybb$^+$.

Le tableau -23- présente la radioactivité spécifique des ARNr, celle des ARN solubles (ARN de transfert et ARNr 5S) ainsi que le rapport ARNr/ARN solubles ; les ARN solubles constituent un témoin interne pour ces expériences. On voit que :

- Les radioactivités spécifiques des ARNr extraits des glandes salivaires des mâles bb$^+$/Ybb$^+$, bb$^+$/Ybb$^-$ et bb/Ybb$^+$ sont équivalentes. Par contre, les glandes salivaires des mâles "prémagnifiés" bb/Ybb$^-$ et bb/O ainsi que celles des mâles bb$^+$/O synthétisent plus d'ARNr.
- Mis à part le cas de bb/Ybb$^-$, les radioactivités spécifiques des ARN solubles sont comparables à celles du témoin bb$^+$/Ybb$^+$.
- Les valeurs du rapport des radioactivités spécifiques ARNr/ARN solubles, dans les cellules polytènes des mâles bb$^+$/O, bb/Ybb$^-$ et bb/O sont supérieures à la valeur (voisine de 1) obtenue pour les mâles bb$^+$/Ybb$^+$, bb$^+$/Ybb$^-$ et bb/Ybb$^+$. Ceci suggère une synthèse des ARNr plus accélérée que celle des ARN solubles dans les trois premiers génotypes.

β) Synthèse des ARNr dans les testicules

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau -24-. On retrouve un excès de synthèse des ARNr par rapport aux ARN solubles chez les mâles bb/Ybb$^-$ et bb/O. Les valeurs du rapport ARNr/ARNs sont respectivement de 1,64 et 2,35, alors que le rapport obtenu pour les mâles bb$^+$/Ybb$^+$ est d'environ 1.

Contrairement à ce qui a été remarqué pour les glandes salivaires, les glandes génitales bb$^+$/O ne montrent pas un taux de synthèse des ARNr nettement plus élevé que le témoin (le rapport ARNr/ARNs est de 1,15 pour bb$^+$/O, la valeur obtenue pour le témoin bb$^+$/Ybb$^+$ est 1,00).

TABLEAU -23-

Radioactivité spécifique des ARN extraits des glandes salivaires incubées *in vitro* (1 heure à 25°) dans le Ringer contenant de l'uridine-5-^{3}H .

La mutation *bobbed* utilisée est celle portée par le chromosome In(1)w^{m4}

Radioactivité Spécifique	Génotypes des mâles					
	$bb^{+}/Y\ bb^{+}$	$bb^{+}/Y\ bb^{-}$	$bb^{+}/0$	$bb/Y\ bb^{+}$	$bb/Y\ bb^{-}$	bb/0
ARNr	268	232	450	250	862	538
ARNs	261	218	302	238	526	315
ARNr / ARNs	1,02	1,06	1,49	1,05	1,63	1,70

TABLEAU - 24-

Radioactivité spécifique des ARN extraits des glandes génitales incubées *in vitro* dans les mêmes conditions que celles du tableau-23-.

La mutation *bobbed* utilisée est celle portée par le chromosome $In(1)w^{m4}$.

	Génotype / N° Expérience	$bb^+/Y\ bb^+$	$bb^+/Y\ bb^-$	$bb^+/0$	$bb/Y\ bb^-$	$bb/0$
Radioactivité spécifique	ARNr Exp.1	268	-	-	450	-
	ARNr Exp.2	371	-	418	-	1105
	ARNr Exp.3	379	368	-	-	-
	ARNs Exp.1	283	-	-	273	-
	ARNs Exp.2	371	-	364	-	470
	ARNs Exp.3	410	399	-	-	-
ARNr / ARNs	Exp.1	0,95	-	-	1,64	-
	Exp.2	1,00	-	1,15	-	2,35
	Exp.3	0,92	0,92	-	-	-

b) Synthèse des ARNr *in vivo*

Nous venons de voir dans ce qui précède que les glandes salivaires et les testicules des mâles bb^+/O et bb^+/Ybb^- ainsi que les mâles "prémagnifiés" bb/Ybb^- et bb/O, synthétisent *in vitro* les précurseurs des ARNr, à un taux plus élevé sinon égal à celui des mâles témoins bb^+/Ybb^+. Ces précurseurs ne peuvent pas se découper en 28S et 18S stables. Nous avons voulu vérifier :

- Que les taux de synthèses mesurés *in vitro* se retrouvent *in vivo*.

- Que les précurseurs peuvent se transformer en ARNr maturés 28S et 18S.

Les expériences nous permettant de répondre à ces deux questions ont été réalisées sur les mâles $In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$ (prémagnifiés) et bb^+/Ybb^+ (témoin). Les ARN sont marqués par injection, dans l'abdomen des mouches, de précurseurs radioactifs (Uridine-5-^{3}H, 0,5 mCi/ml dans le Ringer).

1) Les taux de synthèses mesurés *in vitro* se retrouvent-ils *in vivo ?*

Le tableau -25- montre les résultats obtenus après le marquage des mouches à l'uridine-5-^{3}H (4 heures à 25°C) ; l'ARN total extrait des mouches entières est purifié sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr. Ces résultats confirment ceux obtenus *in vitro* en incubant soit des glandes salivaires, soit des glandes génitales. On retrouve à nouveau un excès de synthèse des ARNr chez les mâles $In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$. La valeur du rapport ARNr/ARNs est de 1,68 ; elle est égale à 1,1 pour les mâles témoins.

2) Les précurseurs des ARNr, synthétisés en excès chez les mâles bb/Ybb^-, se transforment-ils en ARNr 28S et 18S ?

Nous avons vu, que le produit primaire des gènes 28S et 18S est une molécule d'ARNr 38S, qui est le précurseur commundes ARNr 28S et 18S. L'ARNr 38S subit, peu après sa transcription, des modifications (méthylation et découpage par des enzymes spécifiques) qui conduisent aux ARNr stables 28S et 18S. La question se pose donc de savoir si, dans le cas

TABLEAU - 25 -

Radioactivité spécifique des ARN marqués *in vivo* (4 heures à 25°C) à l'uridine-5-^{3}H.

		Génotype des mâles	
		$bb^{+}/Y\ bb^{+}$	$In(1)w^{m^4}\ bb/Y\ bb^{-}$
Radioactivité spécifique	ARNr	494	876
	ARNs	447	520
$\frac{ARNr}{ARNs}$		1,1	1,68

des bobbed "prémagnifiés" (bb/Ybb^-), les précurseurs 38S synthétisés en excès se découpent correctement. Peut être trouvera-t-on aussi une explication simple du phénotype bobbed fort des mâles bb/Ybb^-..

On injecte de l'uridine-5-^3H (0,5 mCi/ml) à des mâles $In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$ et bb^+/Ybb^+. Les ARN sont extraits après 20 minutes et 60 minutes de marquage et sont purifiés par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Qu'il s'agisse des mâles bb/Ybb^- ou bb^+/Ybb^+, les ARNr marqués pendant 20 minutes sont élués de la colonne après les ARNr non radioactifs préexistants (figures -28a et b-). Ce décalage entre le profil de densité optique et le profil de radioactivité, indique que les ARNr synthétisés pendant cet intervalle de temps sont encore en majorité sous forme de précurseurs 38S et 30S.

Après 60 minutes de marquage, les ARNr radioactifs sont élués en même temps que les ARNr non marqués. L'écart entre le profil de radioactivité et le profil de densité optique disparait complètement (figure -28c et d-).

Ces expériences indiquent donc que les précurseurs des ARNr sont découpés en des ARNr de taille plus petite, élués de la colonne en même temps que les ARNr 28S et 18S préexistants. Mais elles ne permettent pas de voir si, dans le cas des mâles bb/Ybb^-, une partie au moins de ces ARNr formés ne se trouve pas sous une forme intermédiaire entre le 28S et le 18S, conséquence d'un mauvais découpage des précurseurs.

Quand on soumet à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à 2,2 %, les ARN extraits des mâles bb/Ybb^- et bb^+/Ybb^+, marqués pendant 60 minutes, on obtient pour chacune des souches deux pics principaux qui correspondent aux ARNr 28S et 18S (Figures -29a et b-). Les précurseurs des ARNr synthétisés en excès par les mâles bb/Ybb^- se découpent donc normalement en donnant les deux espèces 28S et 18S. Ces résultats infirment l'hypothèse selon laquelle, chez les mâles "prémagnifiés bb/Ybb^-, les précurseurs des ARNr ne subiraient pas toutes les étapes de la maturation.

En résumé, les mâles "prémagnifiés" bb/Ybb^- se caractérisent par :

- Un déficit en ADNr, dans les tissus diploïdes de la larve, cohérent avec leur phénotype bobbed fort.

- Une quantité d'ADNr dans les tissus polytènes, peu (ou pas) différente de celle des mâles témoins (bb^+/Ybb^+).

Figure 28. Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée Kieselguhr de l'ARN extrait des mouches marquées *in vivo* à l'uridine-5-^{3}H.

o——o Densité optique •——• Radioactivité

- 20 min. d'incorporation (a) ♂ In(1)w^{m4}bb/Ybb^{-};
  (b) ♂ bb^{+}/Ybb^{+}
- 60 min. d'incorporation (c) ♂ In(1)w^{m4}bb/Ybb^{-} ;
  (d) ♂ bb^{+}/Ybb^{+}

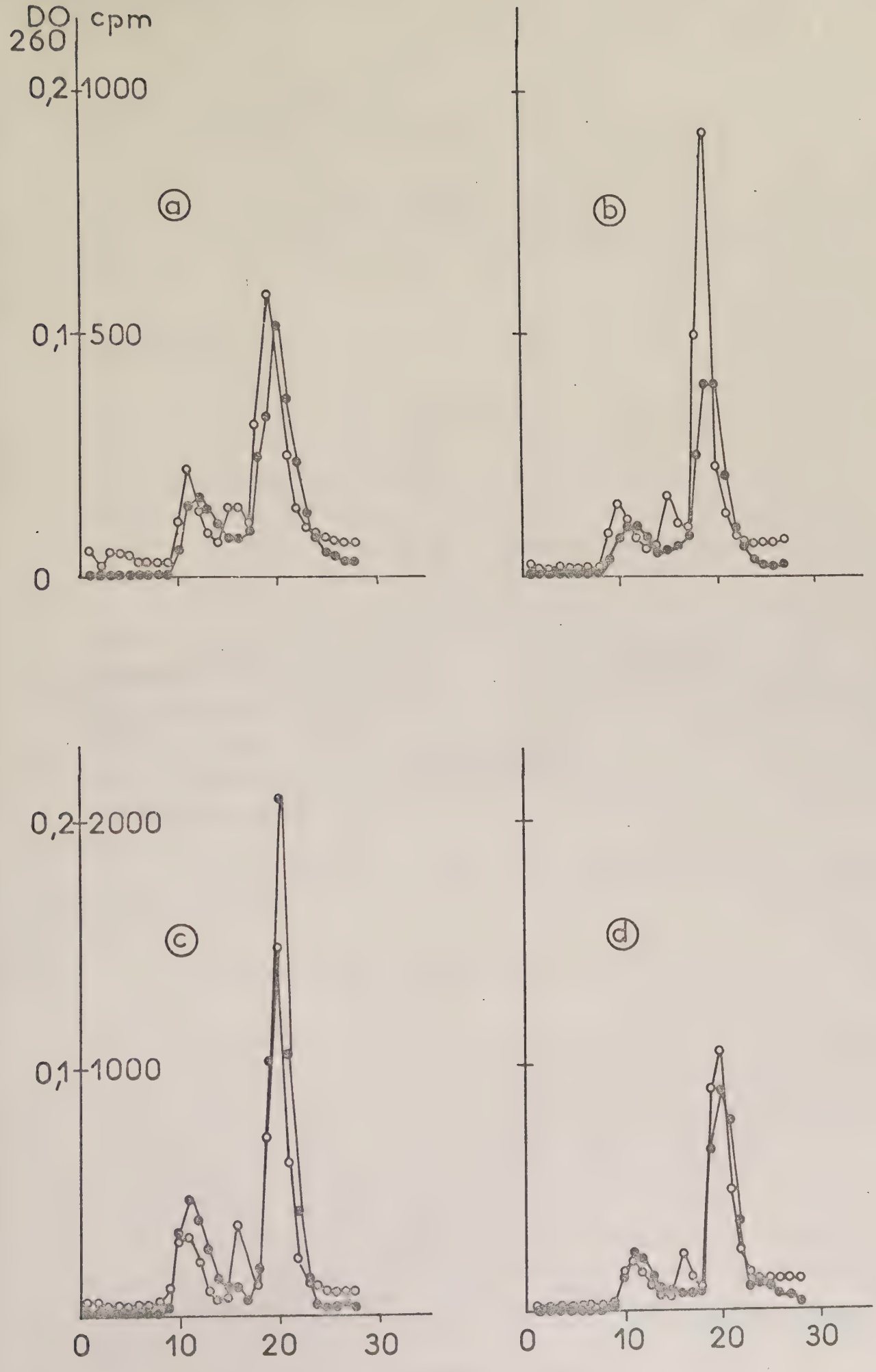
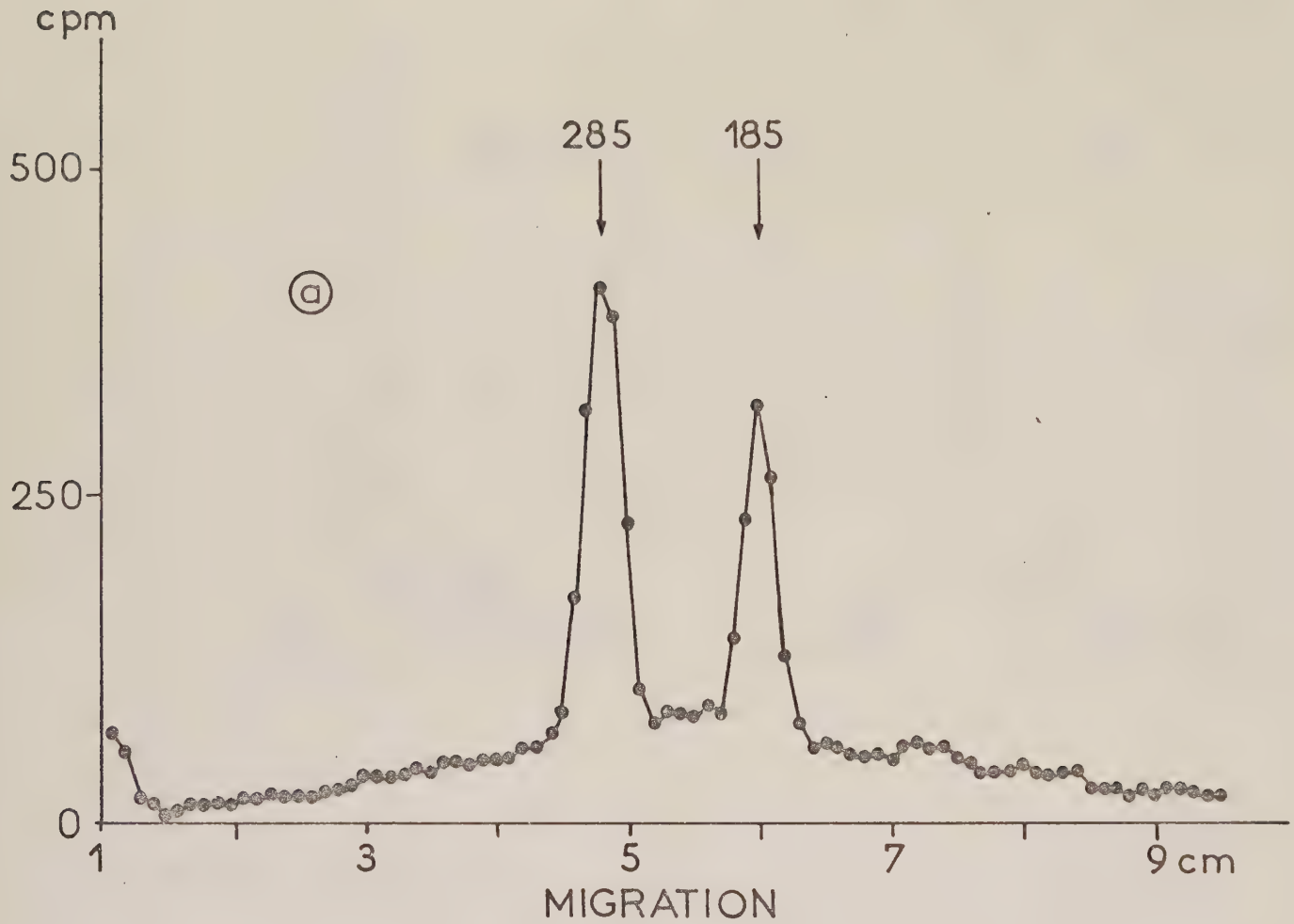
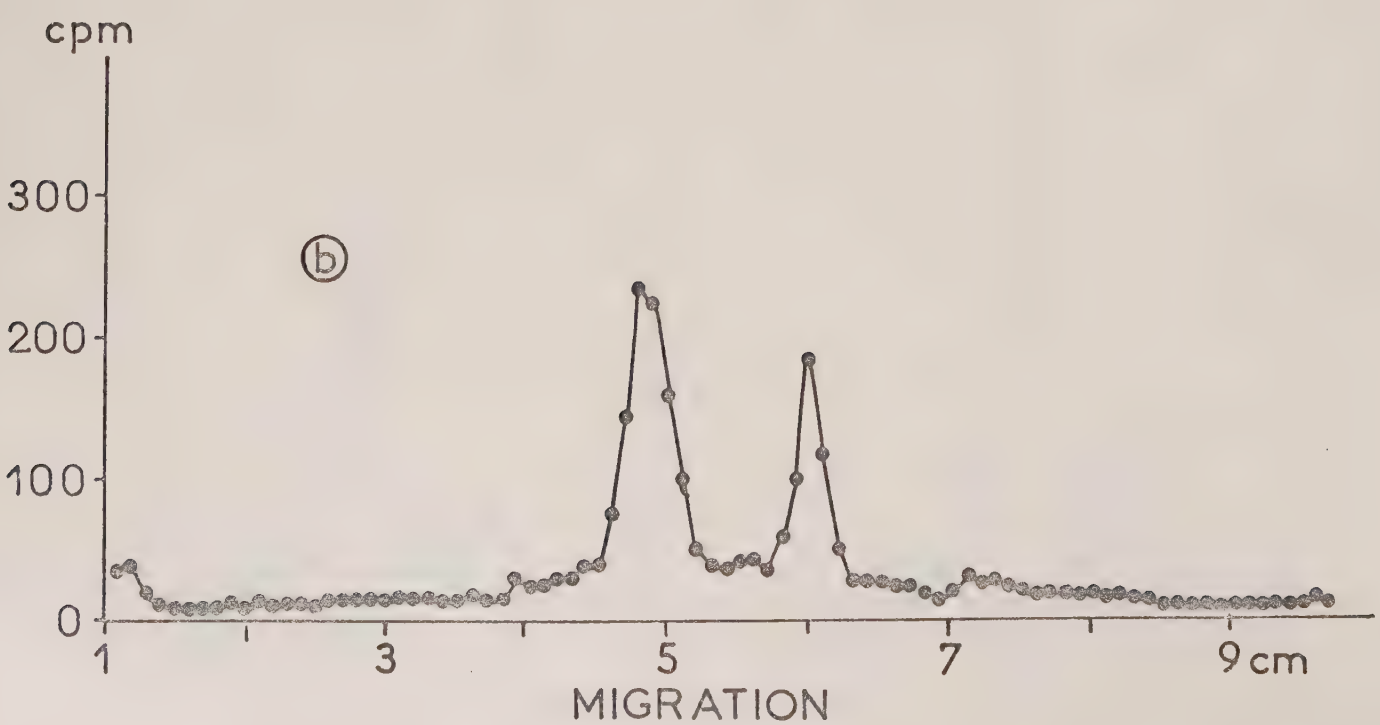

DO
260
0,2
0,1
0
cpm
1000
500
a
b
2000
1000
c
d
0
10
20
30
N° Fractions

Figure 29. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (2,2 %) de l'ARN extrait des mouches marquées *in vivo* à l'uridine-5-^{3}H pendant 60 min. (migration 150 min.)
(a) ♂ In(1)w^{m4}bb/Ybb^{-} ; (b) ♂ bb^{+}/Ybb^{+}





- Un pourcentage d'ADNr dans l'adulte au moins égal à la valeur trouvée dans les tissus diploïdes des larves de même génotype.

- Un excès de synthèse d'ARNr obtenu dans l'adulte entier (*in vivo*), et dans les glandes génitales, et dans les glandes salivaires (incubées *in vitro*).

C - DISCUSSION

A partir des résultats obtenus avec les tissus polytènes et les tissus diploïdes des larves, ainsi qu'avec les mâles adultes de différentes constitutions génétiques (bb^+/Ybb^+, bb^+/Ybb^-, $bb^+/0$, bb/Ybb^+, bb/Ybb^- et bb/0), il nous paraît intéressant d'engager la discussion sur certaines propriétés de l'ADNr de *Drosophila melanogaster* : sa réplication, sa transmission et sa transcription.

En étudiant des souches ayant 1 à 4 organisateurs nucléolaires, RITOSSA et coll. (1965) ont montré clairement que l'ADNr est associé à l'organisateur nucléolaire. Cette localisation a été ultérieurement confirmée par hybridation *in situ* de l'ARNr à l'ADN nucléolaire des glandes salivaires de *Drosophila hydei* (PARDUE et coll. 1970. Chez *Drosophila melanogaster*, les deux organisateurs nucléolaires sont localisés dans l'hétérochromatine des chromosomes X et Y (KAUFMAN 1934 ; COOPER 1959).

Plusieurs mécanismes de régulation interviennent dans le fonctionnement de l'ADNr :

a) Variation des quantités d'ADNr

Chez plusieurs organismes supérieurs et en particulier les amphibiens, les oocytes multiplient le nombre de leurs gènes ribosomiques 28S et 18S (BROWN et DAWID 1968 et GALL 1969) par un processus d'amplification génétique. L'ADNr amplifié est extrachromosomique et se distingue de l'ADNr des cellules somatiques qui contient 4,5 % de 5-méthyl cytosine, par le fait qu'il n'est pas méthylé (DAWID et coll. 1970).

L'amplification de l'ADNr intervient aussi dans les cellules autres que la lignée germinale : KOCH et coll. (1971) ont montré que des cellules de foie d'homme en culture, amplifient les gènes ribosomiques

environ 1,8 fois après traitement par une hormone, la triiodothyronine. COLLINS (1972) obtient des résultats analogues chez le triton en étudiant les quantités d'ADNr dans les cellules de l'iris après ablation du cristallin ; dans ces conditions, il observe une amplification de l'ADNr d'environ 1,6 fois.

Chez *Chlamidomonas reinhardi*, HOWELL (1972) montre une variation des quantités d'ADNr au cours du cycle cellulaire ; il observe une variation allant du simple au triple (phase S).

Chez les plantes supérieures, AVANZI et coll. (1973) montre que chez l'oignon (*Allium cepa*) les cellules des extrémités des racines répliquent leur ADNr plusieurs milliers de fois.

Chez *Drosophila melanogaster*, les résultats présentés dans ce travail montrent également des variations dans le nombre de gènes codant pour les ARNr 28S et 18S (tableau -22-).

- Dans les mâles sauvages bb^+/Ybb^+

Le pourcentage d'ADNr est 5 à 6 fois plus faible dans les cellules polytènes que dans les cellules diploïdes d'un même individu. Ceci confirme les résultats de SPEAR et GALL (1973) sur *Drosophila melanogaster* et ceux de HENNING et MEER (1971) sur *Drosophila hydei*. Les résultats indiquent que l'ADNr dans les cellules polytènes est moins répliqué que l'euchromatine. En admettant, que l'euchromatine se replique 10 fois (SWIFT et RASH 1954) on a calculé que l'ADNr ne se réplique qu'environ 6 à 7 fois.

- Dans les mâles à un seul organisateur nucléolaire (bb^+/O)

En comparant les quantités d'ADNr dans les mâles sauvages bb^+/Ybb^+ et bb^+/O, nous obtenons le même pourcentage d'ADNr dans les tissus polytènes, alors que dans les tissus diploïdes, ce pourcentage va du simple (bb^+/O) au double (bb^+/Ybb^+). Les glandes salivaires des mouches bb^+/O compensent donc l'absence d'un organisateur nucléolaire.

Cette situation rappelle l'amplification de l'ADNr dans les oocytes de *Xenopus laevis*. Les individus, qu'ils aient un seul ou deux organisateurs nucléolaires, produisent des quantités équivalentes d'ADNr (WALLACE et coll. 1966).

- Dans les mâles bobbed "prémagnifiés" (bb/Ybb^- et $bb/0$).

On retrouve comme dans le cas de $bb^+/0$, une compensation en ADNr dans les glandes salivaires. Dans les tissus diploïdes, le pourcentage d'ADNr est en rapport avec le phénotype bobbed fort des mouches comme attendu.

D'autre part, en mesurant l'ADNr dans la mouche entière, nous avons trouvé que les mouches $bb^+/0$ contiennent environ 75 % d'ADNr par rapport aux mouches bb^+/Ybb^+, ce qui confirme les résultats de TARTOF (1971). Les valeurs obtenues dans ce cas sont intermédiaires entre celles des tissus diploïdes et des tissus polytènes. L'excès d'ADNr dans les mouches $bb^+/0$ s'interprèterait simplement par une "compensation" en ADNr dans les cellules polytènes des adultes.

Plus récemment, SPEAR (1974) obtient des résultats analogues, en mesurant l'ADNr dans les glandes salivaires de *Drosophila melanogaster* ayant 1, 2, 3 et 4 organisateurs nucléolaires.

Le mécanisme de "compensation" (TARTOF 1971) agirait au niveau de la réplication de l'ADNr soit en augmentant le degré de polytènie (cas des mâles $bb^+/0$) soit en le réduisant (cas des tissus ayant plus de deux organisateurs nucléolaires). Ce mécanisme est essentiellement somatique. Comme l'a observé TARTOF (1971), les mouches à un seul organisateur nucléolaire ne transmettent pas à leurs descendants l'ADNr excédentaire.

HENNIG et MEER (1971) et MAC GREGOR (1973) ont proposé un modèle selon lequel chez la mouche sauvage à deux organisateurs nucléolaires (bb^+/Ybb^+), seul l'ADNr d'un organisateur nucléolaire se réplique, l'autre organisateur restant inactif.

Nous proposons un mécanisme alternatif : il est possible que l'ADNr dans les cellules polytènes intervienne dans la régulation de sa propre synthèse. A partir d'un niveau d'ADNr toujours le même, quel que soit le génotype, on peut imaginer une inhibition de l'ADN polymérase. L'encombrement de l'organisateur nucléolaire par l'ADNr bloquerait alors l'initiation de la réplication ; c'est une régulation quantitative.

Cependant, ces hypothèses sont difficiles à tester : dans les glandes salivaires, l'hétérochromatine est concentrée dans le chromocentre ; de ce fait il n'est pas possible de distinguer les organisateurs nucléolaires les uns des autres ni de tester leur activité individuelle. Enfin, il est intéressant de noter les résultats obtenus par BROWN et coll. (1972) : dans l'hybride entre *Xenopus laevis* et *Xenopus mullerii*, seul l'organisateur nucléolaire de *Xenopus laevis* est amplifié.

Dans les mâles "prémagnifiés", nous avons montré que la quantité d'ADNr dans l'ensemble de la mouche adulte est supérieure à celle trouvée dans les cellules diploïdes. Ces mouches réversent vers $[bb^+]$ dans les générations ultérieures, c'est la "magnification" (RITOSSA 1968a ; LOCKER et PRUD'HOMME 1973). Comme nous l'avons déjà mentionné, la "compensation" à elle seule n'explique ni l'excès d'ADNr dans les mouches "prémagnifiées", ni la réversion. En effet, la "magnification" diffère de la "compensation" par quatre critères au moins :

- La "magnification" est limitée aux mâles, alors que la "compensation" se manifeste dans les deux sexes (TARTOF 1971).

- La "magnification" intéresse les mâles phénotypiquement bobbed fort ; la "compensation" intéresse aussi bien les mâles $[bb^+]$ que les mâles bobbed.

- La "magnification" intervient pour des allèles bobbed de l'X ou de l'Y (BONCINELLI et coll. 1972) alors que la "compensation" est limitée aux allèles bobbed liés au chromosome X (TARTOF 1971).

- L'ADN en excès dû à la "magnification" est héritable, par contre la "compensation" est essentiellement somatique.

Il est donc raisonnable de penser qu'une partie au moins de l'ADNr excédentaire observé dans les mâles "prémagnifiés" se trouve dans les cellules de la lignée germinale qui ne sont ni polyploïdes ni polytènes.

Le mécanisme moléculaire de la "magnification" n'est pas encore clair. Deux explications ont été proposées :

- "Crossing over" inégaux somatiques entre chromatides soeurs permettant d'augmenter la redondance des gènes (TARTOF 1973). Dans ce cas, on peut donner l'interprétation suivante à l'ADNr excédentaire mesuré dans la mouche entière de génotype bb/Ybb^- et bb/0 (prémagnifiés) : dans ces mâles, le degré de réplication de l'ADNr dans certaines cellules polytènes de l'adulte, serait plus élevé que celui déterminé dans les glandes salivaires. En effet, aucune raison n'oblige à supposer que le degré de réplication de l'ADNr est le même pour toutes les cellules

polyténiques d'un génotype donné. Mais il faut remarquer que cette réplication supplémentaire serait spécifique des mâles "prémagnifiés".

- Synthèse d'ADNr circulaire extrachromosomique dans des cellules de la lignée germinale des mâles "prémagnifiés" suivie de l'intégration des cercles dans le chromosome à la manière d'un épisome (RITOSSA 1972 ; LOCKER 1973).

Ce modèle, qui laisse prévoir une amplification spécifique de l'ADNr dans les cellules gamétiques des mâles "prémagnifiés" est actuellement testé par D. LOCKER.

b) Transcription de l'ADNr.

La quantité d'ARNr synthétisée n'est pas uniquement fonction de la quantité d'ADNr présent. Plusieurs mécanismes semblent intervenir dans la régulation de cette synthèse.

1) Si on compare les résultats obtenus avec les mâles bb^+/Ybb^+ et bb^+/Ybb^- phénotypiquement sauvages :

- Dans les glandes salivaires (tableau -26-) où la quantité d'ADNr est équivalente, la synthèse des ARNr est sensiblement identique dans les deux types de mâles. Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle un seul organisateur nucléolaire est repliqué et transcrit dans les tissus polytènes.

- Dans les tissus diploïdes (tableau -27-) (glandes génitales), qu'il s'agisse des mâles bb^+/Ybb^+ à deux organisateurs nucléolaires, ou des mâles bb^+/Ybb^- à un seul organisateur nucléolaire (ayant moitié moins d'ADNr), le taux de synthèse des ARNr est de nouveau identique. Il y a donc une compensation (hypothèse dosage - compensation de KIEFFER (1968)) qui peut être interprétée soit par un seul organisateur nucléolaire transcrit chez les mâles bb^+/Ybb^+ soit par une suractivation du seul organisateur nucléolaire des mâles bb^+/Ybb^-. KRIDER et PLAUT (1972), étudiant des préparations cytologiques de neuroblastes ayant 3 et 4 organisateurs nucléolaires, n'observent pas plus de deux constrictions secondaires correspondant probablement à deux organisateurs nucléolaires actifs ; ce résultat est en faveur de l'hypothèse selon laquelle le seul organisateur nucléolaire des mâles bb^+/Ybb^- est suractivé.

TABLEAU -26-

Pourcentages d'ADNr et rapports des radioactivités spécifiques des ARNr sur les ARN solubles dans les glandes salivaires.

	Génotypes des mâles				
	bb^+/Ybb^+	bb^+/Ybb^-	$bb^+/0$	$In(1)w^{m4}bb/Ybb^-$	$In(1)w^{m4}bb/0$
% ADNr	0,085	0,066*	0,079*	0,060*	0,059*
$\frac{ARNr}{ARNs}$	1,02	1,06	1,49	1,63	1,70

*Excès d'ADNr par rapport à ce qui est attendu (0,085/2)

T A B L E A U -27-

Pourcentages d'ADNr dans les cellules diploïdes (disques imaginaux et cerveaux) des larves, et, rapports des radioactivités spécifiques des ARNr sur les ARN solubles dans les glandes génitales de l'adulte.

	GENOTYPES DES MALES				
	bb^+/Ybb^+	bb^+/Ybb^-	bb^+/O	$\frac{In(1)w^{m4}bb}{Ybb-}$	$\frac{In(1)w^{m4}bb}{O}$
% ADNr (cerveaux)	0,442	0,255	0,246	0,174	0,157
ARNr/ARNs (testicules)	0,96	0,92	1,15	1,64	2,35

2) Si on compare les résultats obtenus avec les mâles bb^+/Ybb^- et bb^+/O de phénotype sauvage $[bb^+]$ (tableaux -26- et -27-) on voit que les quantités d'ADNr sont équivalentes pour les deux souches qu'il s'agisse de glandes salivaires ou de tissus diploïdes. Néanmoins, nous avons mis en évidence un net excès de synthèse d'ARNr dans les tissus polytènes et un léger excès dans les tissus diploïdes des mâles bb^+/O par rapport aux mâles bb^+/Ybb^-. Ces résultats montrent une corrélation entre l'excès de synthèse des ARNr et l'absence du chromosome Y. Peut être ce dernier contiendrait-il un ou plusieurs facteurs de régulation de la synthèse des ARNr 28S et 18S. Un argument en faveur de cette interprétation tire son origine des expériences de KRIDER et PLAUT (1972) : ils comparent la synthèse de l'ARN nucléolaire dans les glandes salivaires d'individus à un seul organisateur nucléolaire (♀ bb^+/No^- et ♂ bb^+/O) et à deux organisateurs nucléolaires (♀ bb^+/bb^+ et ♂ bb^+/Ybb^+). Après marquage *in vitro* des glandes salivaires à l'uridine-^3H, ils montrent par autoradiographie que le taux d'incorporation est identique pour les femelles à un et deux organisateurs nucléolaires et pour les mâles bb^+/Ybb^+ (2 organisateurs nucléolaires). En revanche, le taux d'incorporation est plus élevé pour les mâles bb^+/O (sans chromosome Y). Ce résultat montre qu'il existe des facteurs de régulation liés non seulement à l'Y mais aussi à l'X.

3) Si on compare les mâles "prémagnifiés" bb/Ybb^- et bb/O (phénotypiquement bobbed) et les mâles bb^+/Ybb^- (sauvages), on trouve un net excès de synthèse d'ARNr dans les males "prémagnifiés". Cet excès de synthèse est observé dans les glandes salivaires comme dans les tissus diploïdes (testicules) et aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Plusieurs interprétations peuvent être envisagées :

- On peut imaginer que les mâles "prémagnifiés" bb/Ybb^- et bb/O contiennent de l'ADNr "amplifié" dans les glandes génitales. Ce qui pourrait expliquer l'excès de synthèse observé dans ces glandes. Mais nous avons observé aussi un excès de synthèse dans les glandes salivaires de ces mâles et nous y avons vu autant d'ADNr (sinon moins) que dans les glandes salivaires des mâles bb^+/Ybb^+, bb^+/Ybb^- et bb^+/O.
Donc cette interprétation n'explique pas tous les résultats obtenus.

- L'excès de synthèse des ARNr peut être dû au chromosome particulier portant la mutation bobbed ($In(1)w^{m4}bb$) : on peut penser que l'inversion a touché le mécanisme de contrôle de la transcription de l'ADNr. Deux arguments au moins vont à l'encontre de cette explication :

1 - on n'observe pas d'excès de synthèse chez les mâles bb/Ybb^{+}.

2) RITOSSA et coll. (1971) étudiant une mutation bobbed déficiente en ADNr et portée par un chromosome X de structure normale, montraient que les glandes génitales des mâles bb/Ybb^{-} et bb/O synthétisent plus d'ARNr que les mâles bb^{+}/Ybb^{+} ou bb/Ybb^{+}.

- La synthèse excédentaire d'ARNr peut être liée au phénotype bobbed des mouches. Cependant MOHAN et RITOSSA (1970) étudiant *in vitro* la synthèse des ARNr dans des ovaires de mouches bobbed (ayant une mutation bobbed partiellement déficiente en ADNr, associée soit à une déficience totale (♀ bb/No^{-}), soit à une autre mutation bobbed également partiellement déficiente en ADNr), ont montré que cette synthèse est réduite dans les ovaires bobbed par rapport aux ovaires bb^{+} (bb^{+}/bb^{+} où bb^{+}/bb). Il est clair que l'excès de synthèse est lié à la mutation bobbed mais uniquement chez les mâles quand elle est associée à une déficience (Ybb^{-} ou chez les mâles sans Y). Il est possible que chez ces mâles (prémagnifiés), le déficit en ADNr, fait intervenir un mécanisme, encore inconnu, permettant d'accélérer la synthèse des ARNr.

D'autres mécanismes de régulation de la synthèse des ARNr chez *Drosophila melanogaster* n'ont pas encore été étudiés. En particulier la régulation de cette synthèse au cours du développement. Il est possible que certains hormones pourraient intervenir. En effet, on sait que la synthèse d'ARNr dans la prostate de souris est augmentée par la testostérone (BROWN et DAWID 1968). D'autre part PETRI (1971) montre que l'addition de la β ecdysone au milieu de culture de disques imaginaux de *Drosophila melanogaster*, stimule la production des précurseurs ribosomiques et leur maturation.

L'étude que nous avons menée montre bien la complexité du système, dûe probablement au rôle important qu'assument les ARNr dans la vie de la cellule.

CONCLUSIONS GENERALES

et

RESUME

Le travail que nous avons présenté entre dans le cadre d'une étude portant sur la régulation de la synthèse des ARN ribosomaux dans l'espèce *Drosophila melanogaster*. Chez ce diptère, les gènes codant pour les ARNr 28S et 18S sont groupés au locus bobbed (nous appelons ADNr, l'ADN qui s'hybride avec les ARNr 28S et 18S). Les mutants bobbed dont la plupart sont déficients en ADNr se caractérisent par un développement larvaire retardé, des soies courtes et fines et un abdomen plus ou moins déformé.

Cette étude comporte trois aspects :

1) Variabilité des quantités d'acides nucléiques par individu au cours des stades du développement chez un mutant bobbed déficient en ADNr et chez la souche sauvage bb^+.

2) Sélection après mutagénèse à l'ethyl méthane sulfonate d'une collection de mutants bobbed :

- Etude physiologique et détermination des quantités d'ADNr pour chacun des mutants.

- Etude d'un mutant bobbed particulier, possédant une quantité normale d'ADNr.

3) Etude de l'ADNr dans les tissus diploïdes et polyténiques d'individus sauvages et mutants.

I - Variabilité des quantités d'acides nucléiques par individu au cours du développement.

Cette étude nous a permis de montrer que, dans le cas d'une souche bobbed déficiente en ADNr, la croissance est lente et que le poids par individu est toujours inférieur à celui de la souche sauvage. Parallèlement on observe une réduction des quantités d'ADN et d'ARN par individu. L'estimation du rapport ARN/ADN en fonction de l'âge des mouches a montré qu'un important écart existe entre les deux souches au cours des premiers stades du développement larvaire pendant lesquels les valeurs du rapport sont les plus élevées. Il est probable qu'une synthèse importante d'ARNr à ces stades est nécessaire pour préparer la pupaison et l'émergence de l'adulte.

A la lumière de ces résultats, nous avons discuté l'hypothèse de MOHAN et RITOSSA (1970) selon laquelle l'allongement des stades larvaires des mouches bobbed permettrait de normaliser les quantités d'ARNr par cellule.

II - Sélection de mutants bobbed et étude des mutants non déficients en ADNr

Notre idée de départ était que la transcription de l'ensemble des gènes ribosomaux (ADNr 28S et 18S) est sous le contrôle d'une région régulatrice. En conséquence, une mutation dans cette région pourrait conduire à un phénotype bobbed, sans que le nombre de ces gènes soit changé. Nous nous sommes donc proposé de sélectionner et d'étudier de nouveaux mutants de la région bobbed, produits sous l'action d'un agent mutagène connu pour induire principalement des mutations ponctuelles (éthyl méthane sulfonate).

Sept mutants bobbed ont été obtenus (bb^{P1}, bb^{P2}, bb^{P3}, bb^{P4}, bb^{P5}, bb^{P6} et bb^{P8}), et nous avons déterminé la quantité d'ADNr de chacun d'eux.

Nous avons mis ainsi en évidence deux classes de mutants bobbed :

Les uns bb^{P5}, bb^{P6} et bb^{P8}, possédent moins d'ADNr que la souche initiale. Leur expression phénotypique est en rapport avec leur quantité d'ADNr.

Les autres (bb^{P1}, bb^{P2}, bb^{P3} et bb^{P4}) possèdent plus d'ADNr que ne laisserait prévoir leur phénotype. Toutes les mutations sont léthales à l'état homozygote à l'exception de bb^{P2} qui a une viabilité réduite (5 %). Les femelles homozygotes bb^{P2}/bb^{P2} viables sont de phénotype bobbed extrême et stériles.

Pour rendre compte de cette dernière classe de mutations, notre hypothèse de travail était qu'il pouvait s'agir de mutations portant sur la régulation de la transcription de l'ADNr. Selon cette hypothèse l'ARNr produit par ces mutants, devrait être qualitativement identique à celui synthétisé par une souche bb^{+} mais son taux de synthèse devrait être réduit. Nous avons étudié le mutant bb^{P2}, seul subléthal, à l'état homozygote, pour vérifier notre hypothèse.

Les études physiologiques nous ont permis de montrer que la mutation bb^{P2} présente un effet additif avec les mutations bobbed partiellement déficientes en ADNr. Cependant, elle ne complèmente ni avec celles-ci, ni avec les mutations non déficientes en ADNr. Les homozygotes bb^{P2}/bb^{P2} meurent à tous les stades du développement.

Nous avons vérifié que le mutant bb^{P2} contenait bien une quantité normale d'ADNr en effectuant des mesures soit sur des femelles bb^{P2}/bb^{+} soit sur des mâles bb^{P2}/Ybb^{+} soit sur des femelles bb^{P2}/bb^{P2}, voire même sur des ovaires bb^{P2}/bb^{P2}. Puis nos études ont porté essentiellement sur l'analyse quantitative et qualitative des ARNr synthétisés par ce mutant.

L'incorporation "*in vitro*" et "*in vivo*" d'un précurseur radioactif des ARNr a montré que, globalement, le mutant synthétise les ARNr à un taux aussi élevé, sinon plus, que la souche sauvage.

Les expériences de marquage pendant des temps courts ont montré : d'une part qu'il n'y a pas de blocage de la maturation des précurseurs ; d'autre part, que l'espèce moléculaire 28S est déficitaire par rapport à l'espèce 18S. Les deux espèces étant normalement formées de façon équimolaire à partir d'un précurseur commun (38S), nous avons proposé une hypothèse selon laquelle, la dégradation du 28S pourrait s'expliquer par un défaut qualitatif de séquence le rendant, ou rendant son précurseur immédiat le 30S, plus accessible aux enzymes de dégradation.

D'autre part, nous avons mesuré, la synthèse protéique dans la souche bb^{P2}, soit après un simple marquage à la leucine ^{14}C soit après un double marquage à la leucine ^{14}C et à l'uridine-5-^{3}H. Les résultats obtenus montrent nettement une réduction de la synthèse protéique par rapport à celle de l'ARN. Cette réduction explique le phénotype bobbed exprimé par les mouches.

Enfin nous avons essayé d'analyser les polysomes et ribosomes extraits du mutant bb^{P2} et de la souche sauvage sur gradient de saccharose 10 % à 40 %, après un double marquage à la leucine ^{14}C et à l'uridine-5-^{3}H. Les résultats obtenus montrent d'une part un profil identique pour les deux souches, d'autre part une réduction de la synthèse des protéines par rapport à celle des ARNr dans la souche bb^{P2}. L'hypothèse la plus simple pour expliquer ces résultats, serait que l'efficacité de traduction des ribosomes serait diminuée. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de comparer l'activité des ribosomes extraits des femelles bb^{P2}/bb^{P2} et des femelles sauvages, dans un système acellulaire de traduction. En utilisant le messager artificiel poly (U), nous avons observé une réduction de la capacité de traduction des ribosomes bb^{P2} d'environ 10 %.

Tous ces résultats pourraient s'interpréter par un défaut qualitatif au niveau de l'une des espèces d'ARNr. Il est évident que la seule preuve irréfutable de ce que nous avançons ne pourra être obtenue que par l'étude des séquences.

Des hypothèses ont été discutées, pour rendre compte de l'évènement mutationnel pouvant entraîner une modification qualitative des ARNr transcrits sur une suite de gènes en tandem.

III - Etude de l'ADNr dans les tissus diploïdes et polyténiques d'individus sauvages (bb^{+}) et mutants (bb).

La réversion à haute fréquence des mutants bobbed de l'X déficients en ADNr est un phénomène bien connu chez la Drosophile (RITOSSA 1968, LOCKER et PRUD'HOMME 1973 et, TARTOF 1973), c'est la "magnification" : des mâles bb/Ybb^{-} phénotypiquement bobbed fort donnent dans leur descendans des révertants instables, qui se stabilisent au cours des générations suivantes (le chromosome Ybb^{-} est complètement déficient en ADNr). Ces mâles parentaux "prémagnifiés" ont une quantité d'ADNr, mesurée dans

l'adulte entier, trop élevée pour rendre compte de leur phénotype. Nous appelons également mâles "prémagnifiés" les mâles bb/O (sans chromosome Y) qui ont les mêmes caractères que les mâles bb/Ybb^- (trop d'ADNr et phénotype bobbed fort).

A. - Nous avons regardé chez ces mâles, ainsi que chez les mâles bb^+/Ybb^+ bb^+/O et bb^+/Ybb^- les quantités d'ADNr dans les tissus polytènes et les tissus diploïdes de la larve ainsi que dans l'adulte entier :

1) Dans les glandes salivaires (cellules polytènes), nous avons trouvé que :

- L'ADNr des mâles bb^+/Ybb^+ est 5 à 6 fois plus faible que dans les cellules diploïdes. Dans ces cellules polytènes l'ADNr est sous repliqué par rapport au reste du chromosome. Nous confirmons ainsi les résultats obtenus par d'autres auteurs (SPEAR et GALL 1973 et HENNIG et MEER 1971) sur *Drosophila melanogaster* et *Drosophila hydei*.

- Dans le cas des mâles bb^+/O, bb^+/Ybb^- et des mâles "prémagnifiés" (bb/Ybb^- et bb/O) nous obtenons une quantité d'ADNr voisine de celle du sauvage bb^+/Ybb^+. Des modèles ont été proposés pour rendre compte de cette constance de la quantité d'ADNr dans les tissus polytènes et ceci quelque soit le génotype des larves.

2) Dans les cerveaux et disques imaginaux (cellules diploïdes), nous avons montré que :

- La quantité d'ADNr est proportionnelle au nombre d'organisateurs nucléolaires: Les bb^+/Ybb^+ (2 organisateurs nucléolaires) contiennent environ 2 fois plus d'ADNr que les bb^+/O (un organisateur nucléolaire sur l'X).

- La quantité d'ADNr est proportionnelle au nombre de gènes ribosomaux par organisateur nucléolaire (les bb^+/O contiennent plus d'ADNr que les bb/O) ; dans ces tissus le pourcentage d'ADNr permet donc de mesurer correctement le nombre de gènes.

3) Dans la mouche adulte :

- Pour les mouches phénotypiquement bb^+ (bb^+/Ybb^+, $bb^+/0$ et bb^+/Ybb^-) nous obtenons des valeurs intermédiaires, entre celles des tissus diploïdes et des tissus polytènes, ce qui est normal car dans l'adulte on trouve un mélange des deux tissus (ASHBURNER 1970).

- Par contre pour les mâles "prémagnifiés" (bb/Ybb^- et $bb/0$), les valeurs obtenues sont supérieures ou au moins égales à celles obtenues dans les tissus diploïdes. Ces résultats mettent en évidence chez ces mâles un mécanisme permettant d'augmenter le nombre de gènes ribosomaux dans certaines des cellules. Nous avons discuté ce résultat en tenant compte des différents modèles proposés pour expliquer le mécanisme de la reversion des bobbed.

B. - D'autre part, nous avons étudié la synthèse de l'ARNr :

- Dans les glandes salivaires, où la quantité d'ADNr est équivalente pour toutes les mouches étudiées, la synthèse de l'ARNr est plus forte pour les mâles $bb^+/0$ et les mâles "prémagnifiés" que pour les mâles bb^+/Ybb^+. Il était donc nécessaire d'invoquer un mécanisme de régulation pour expliquer cette synthèse excédentaire d'ARNr.

- Au niveau de l'adulte entier *"in vivo"* et dans les glandes génitales (tissus en majorité diploïdes) incubées *"in vitro"*, nous retrouvons également chez les mâles "prémagnifiés" une synthèse excédentaire des ARNr.

En conclusion, l'ensemble des résultats actuellement connus sur le locus bobbed de *Drosophila melanogaster*, montre qu'il existe plusieurs niveaux de régulation de la synthèse des ARNr :

1) Au niveau de l'ADNr :

a - "Compensation de l'ADNr" : mécanisme conduisant à une régulation de l'ADNr au cours de la polyténisation qui ne dépend pas du nombre d'organisateurs nucléolaires.

b - "Magnification": mécanisme aboutissant à une réversion des mutants bobbed déficients en ADNr.

2) Au niveau de la transcription :

a - "Dosage compensation" : mécanisme de régulation conduisant à une synthèse d'ARNr dans les mouches ayant un seul organisateur nucléolaire comparable à celles des mouches ayant deux organisateurs nucléolaires.

b - Rôle du chromosome Y : l'intervention du chromosome Y dans la régulation de la synthèse des ARNr a été mis en évidence en comparant cette synthèse dans des mâles bb^{+}/O (sans chromosome Y) et dans des mâles bb^{+}/Ybb^{-}.

c - Dans les individus bobbed "prémagnifiés" : la mise en évidence d'une synthèse excédentaire d'ARNr, suppose l'intervention d'un troisième mécanisme qui semble être lié au déficit en ADNr.

Enfin, d'autres mécanismes de régulation de la synthèse de l'ARNr dont on soupçonne l'existence, n'ont pas encore été étudiés, en particulier, la régulation de cette synthèse au cours du développement.

- B I B L I O G R A P H I E -

ALDERSON, T. (1965) Chemically induced delayed germinal mutation in Drosophila.
Nature 207 : 164.

ASHBURNER, M. (1970) Function and structure of polytene chromosomes during insect development.
Advanc. Insect. Physiol. 7 : 1

AUBERT, M., J.F. SCOTT, M. REYNIER and R. MONIER (1968) Rearrangement of the conformation of Escherichia coli 5S RNA.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 61 : 292

AVANZI, S., F. MAGGINI and A.M. INNOCENTI, (1973) Amplification of ribosomal cistrons during the maturation of the metaxylen in the root of allium cepa.
Protoplasma 76 : 197

BAKER, W.K., (1971) Evidence for position-effect suppression of the ribosomal RNA cistrons in Drosophila melanogaster.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 68 : 2472

BARDES-GRIVET, M.F., (1971) Etude cytologique de l'oeuf de Drosophile après centrifugation.
Thèse de Doctorat 3ème Cycle, Université Paris-Sud.

BERNARD, H., and FIXLER, J., (1963) Uric acid content of Drosophila melanogaster during and after metamorphosis.
J. Physiol. Zool. 36 : 244

BERNARDI, G. (1969) Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite I. Chromatography of native DNA.
Biochem. Biophys. Acta 174 : 423

BIRD, M.J., and O.G. FAHMY, (1953) Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in Drosophila melanogaster.
Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B, 140 : 556

BIRNSTIEL, M., H. WALLACE, J.L. SIRLIN, and M. FISCHBERG, (1966) Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer regions of Xenopus laevis.
Natl Cancer. Inst. Monograph. 23 : 431

BIRNSTIEL, M.L., (1967) Ciba fondation symposium of cell differenciation. (A.V.S. de Renck and J. Knight, Eds) Churchill London 178

BIRNSTIEL, M.L., J. SPEIRS, I. PURDOM, K. JONES, W.E. LOENING, (1968) Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite of Xenopus laevis.
Nature 219 : 454

BLUMENFELD, M., and H.S. FORREST, (1971) Is Drosophila dAT on the Y chromosome ?
Proc. Natl Acad. Sci. USA 68 : 3145

BONCINELLI, E., C. MALVA, F. GRAZIANI, L. POLITO, F.M. RITOSSA, (1972) rDNA magnification at the bobbed locus of the Y chromosome in Drosophila melanogaster.
Cell. Differentiation 1 : 133

BOSHES, R.A., (1970) Drosophila polyribosomes.
J. Cell. Biology 46 : 477

BRAY, G.A., (1960) A simple and efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal. Biochem. 1 : 279

BRIDGES, C.B., and K.S. BREHME, (1944) The mutants of Drosophila melanogaster
Carnegie Inst. Washington Publ. 552

BROWN, D.D., and J.B. GURDON, (1964) Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of Xenopus laevis.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 51 : 139

BROWN, D.D. and I.B. DAWID, (1968) Specific gene amplification in oocytes.
Science 160 : 272

BROWN, D.D., and A.W. BLACKLER, (1972) Gene amplification proceeds by a chromosome copy mechanism.
J. Mol. Biol. 63 : 75

BURTON, K., (1956) A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
J. Biochem. 62 : 315

CALLAN, H.G., (1967) On the organization of genetic units in chromosomes.
J. Cell. Sciences 2 : 1

CHURCH, R.B., and F.W. ROBERTSON, (1966) A biochemical study of the growth of Drosophila melanogaster.
J. Exptl Zool. 162 : 337

CHURCH, R.B., and F.W. ROBERTSON, (1966) Biochemical analysis of genetic differences in the growth of Drosophila.
Gent. Res. 7 : 383

COLLINS, J.M., (1972) Amplification of ribosomal ribonucleic acid cistrons in the regenerating lens of triturus.
Biochemistry 11 : 1259

COOPER, K.W., (1958) A probable heterochromatic deficiency in In(1)Sc^{L8}, the approximate location of bobbed, and the size of block.
Dros. Inf. Serv. 32 : 118

COOPER, K.W., (1959) Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in Drosophila melanogaster and the theory of "heterochromatin".
Chromosoma 10 : 535

DAWID, I.B., D.D. BROWN and R.H. REEDER, (1970) Composition and structure of chromosomal and amplified ribosomal DNA's of Xenopus laevis.
J. Mol. Biol. 51 : 341

DEMEREC, M. (1939) The nature of changes in the White-notch region of the X-chromosome of Drosophila melanogaster.
Proc. 7th Intern. Genetics Congr., 99 : 103

DISHE, Z.,(1930) Über einige neue charakteristische farbeaktionen der thymormkleinsaure und eine mikromethode Zur bestimmung derselben in tierischen organen mit hilfe dieser reactionen.
Mikrochemie 8 : 4

ECHALIER, G., A. OHANESSIAN, (1969) Isolement, en culture in vitro, de lignées cellulaires diploïdes de Drosophila melanogaster.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 268 : 1771

ECHALIER, G., and A. OHANESSIAN, (1970) In vitro culture of Drosophila melanogaster embryonic cells.
In vitro 6 : 162

ESPER, H., and H.J. BARR, (1964) A study of developmental cytology of a mutation affecting nucleoli in Xenopus embryos.
Develop. Biol. 10 : 105

EVANS, B.B., and M.L. BIRNSTIEL, (1968) Localization of amplified ribosomal DNA in the oocyte of Xenopus laevis.
Biochem. Biophys. Acta 166 : 247

FAHMY, O.G., and M.J. FAHMY, (1957) Further evidence for differential effects of mutagens in Drosophila melanogaster.
J. Genetics 54 : 146

FALLING, J., and C.E. WHILEY, (1959) The inhibition of pancreatic ribonuclease by anionic polymers.
Arch. Biochem. Biophys. 85 : 313

FINAMORE, F.J., (1957) A study of a contaminant in amphibian egg extracts which interferes with the diphenylamine reaction for deoxyribonucleic acid.
Explt Cell. Res. 12 : 356

FLECK, A. and H.N. MUNRO, (1962) The precision of ultra violet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic estimation.
Biochem. Biophys. Acta 55 : 571

GALL, J.G., H.C. Mac GREGOR and M.E. KIDSTON, (1969) Gene amplification in the oocyte of Dysticus water beetles.
Chromosoma 26 : 169

GALL, J.G., (1969) The genes for ribosomal RNA during oogenesis.
Genetics (Suppl.) 61 : 121

GALL, J.G., E.H. COHEN and M.L POLAN, (1971) Repetitive DNA sequences in Drosophila.
Chromosoma 33 : 319

GILES, K.W., and A. MYERS, (1965) An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid.
Nature (London) 206 : 93

GILLEPSIE, D. and S. SPIEGELMAN, (1965) A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane.
J. Mol. Biol. 12 : 829

GREENBERG, J.R., (1969) Synthesis and properties of ribosomal RNA in Drosophila.
J. Mol. Biol. 46 : 85

GRIERSON, D. and U.E. LOENING, (1972) Distinct transcription products of ribosomal genes in two different tissues.
Nature (New Biology) 235 : 80

GRIGLIATTI, T.A., B.N. WHITE, G.M. TENER, T.C. KAUFMAN and D.T. SUZUKI, (1974) The localization of transfer RNA_5^{lys} genes in Drosophila melanogaster.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 71 : 3527

HALL, B.D., and S. SPIEGELMAN, (1961) Sequence complementary of T2 DNA and T2 specific RNA.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 47 : 137

HAMKALO, B.A., O.L. MILLER, Jr. and A.H. BAKKEN, (1973) Ultrastructural aspects of genetic activity. In molecular cytogenetics. Edited by B.A. Hamkalo and J. Papaconstantinou Eds. Plenum Corporation. New York

HASHIMOTO, S. a,d MURAMATSU, M., (1972) Differences in nucleotide sequences of ribosomal RNA between the liver and a hepatoma of C_3H/He mice.
Eur. J. Biochem. 33 : 446

HASTINGS, J.R.B., and K.S. KIRBY, (1966) The nucleic acids of Drosophila melanogaster.
J. Biochem. 100 : 532

HAYASHI, M., M.N. HAYASHI and S. SPIEGELMAN, (1963) Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA 50 : 664

HENNING, W. and B. MEER, (1971) Reduced polyteny of ribosomal RNA cistrons in giant chromosomes of Drosophila hydei. Nature (New Biology) 233 : 70

HOTCHKISS, S.K. and J.K. LIM, (1968) Mutagenic specificity of ethyl methane sulfonate affected by treatment methods. Drosophila Inform. Serv. 43 : 116

HOWELL, S.H., (1972) The differential synthesis and degradation of ribosomal DNA during the vegetative cell cycle in Chlamydomonas reinhardi. Nature (New Biology) 240 : 264

JARRY, B. and R. ROSSET, (1971) Heterogeneity of 5S RNA in Esherichia coli. Mol. Gen. Genetics 113 : 43

JENKINS, J.B., (1967) Mutagenesis at a complex locus in Drosophila with the monofunctional alkylating agent, ethyl methane sulfonate. Genetics 57 : 783

KAUFMAN, B.P., (1934) Somatic mitoses of Drosophila melanogaster. J. Morph. 56 : 125

KEN HIGASHI, Tadao MATSUHISA, Sadao GOTOH, Keiji NISHINAGA and Yukiya SAKAMOTO, (1970) Different gene expression for ribosomal RNA of AH 130 Tumor and embryonic and adult rat liver. Biochem. Biophys. Acta 232 : 352

KIEFFER, B.I., (1968) Dosage regulation of ribosomal DNA in Drosophila melanogaster. Genetics 61 : 85

KOCH, J., and GRUCEANN, (1971) Hormone induced gene amplification in somatic cells. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 : 137

KOURILSKY, Ph., S. MANTEUIL, M.H. ZAMANSKY and F. GROS, (1970) DNA-RNA hybridization at low temperature in the presence of urea. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 : 1080

KRIDER, H.M., and W. PLAUT, (1972) Studies on nucleolar RNA synthesis in Drosophila melanogaster. J. Cell Science 11 : 675

KRIEG, D.R., (1962) Ethyl methane sulfonate induced reversion of bacteriophage T4 rII mutants. Genetics 48 : 561

KUMAR, A. (1970) Ribosome synthesis in Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Biol. 45 : 623

LEES, A.D. and C.H. WADDINGTON, (1942) The development of the bristles in normal and some mutant types of Drosophila melanogaster
Proc. Roy. Soc. B 131 : 87

LESLIE, I., (1955) The nucleic acid content of tissus and cells. In Chargaff and Davidson, The nucleic acids, Vol. II, 1-50, Academic Press, New York

LEVENBOOK, L., E.C. TRAVAGLINI and J.L. SCHULTZ (1958) Nucleic acids and their components as affected by the Y chromosome of Drosophila melanogaster.
I - Constitution and amount of the ribonucleic acids in the unfertilized eggs.
Exptl Cell Res. 15 : 43

LEWIS, E.B., and F. BACHER, (1968) Method for feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to Drosophila melanogaster
Drosophila Inform. Serv. 43 : 193

LIM, J.K., and L.A. SNYDER, (1968) The mutagenic effects of two monofunctional alkylating chemicals on mature spermatozoa of Drosophila.
Mutation Res. 6 : 129

LIMA de FARIA, M. BIRNSTIEL and H. JAWORSKA, (1969) Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of acheta.
Genetics 61 (Suppl. 1): 145

LIMBOURG, B., and M. ZALOKAR, (1973) Permeabilization of Drosophila eggs.
Developmental Biol. 35 : 382

LINDSLEY, D.L. and E.H. GRELL (1968) Genetic variations of Drosophila melanogaster
Carnegie Inst. of Washington, Publ. n° 627

LINZEN, B. and G.R. WYATT, (1964) The nucleic acid content of the tissues of Cecropia Silkmoth pupe. Relation to body size and development.
Biochem. Biophys. Acta 87 : 188

LOCKER, D., (1973) Etude de la réversion à haute fréquence des mutants bobbed chez Drosophila melanogaster
Thèse de Doctorat 3ème Cycle, Université Paris VI.

LOCKER, D., and N. PRUD'HOMME, (1973) Etude de plusieurs facteurs faisant varier la fréquence de réversion au locus bobbed chez Drosophila melanogaster
Mol. Gen. Genetics 124 : 11

LOCKER, D. (1975) en préparation

LOENING, U.E., (1967) The fractionation of high-molecular weight RNA by polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biochem. 102 : 252

LOWRY, O.H., N. RISEBROUGHT, A.L. FARR, and R.J. RANDALL, (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 : 265

LUDWIG, D., (1945) The effects of atmospheric humidity on animal life.
Physiol. Zool. 18 : 103

Mac-GREGOR, C.H., (1973) Amplification, polytenisation, and nucleolus organizers.
Nature (New Biology) 246 : 81

MANDELL, J.D., and A.D. HERSHEY, (1960) A fractionating column for analysis of nucleic acids.
Anal. Biochem. 1 : 66

MANS, J. and G.D. NOVELLI, (1961) Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method.
Arch. Biochem. Biophys. 94 : 48

MARMUR, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms.
J. Mol. Biol. 3 : 208

MARRAKECHI, M. and N. PRUD'HOMME, (1971) A study of bobbed mutants induced by ethyl methane sulfonate in Drosophila melanogaster
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 : 273

MARRAKECHI, M., N. PRUD'HOMME, D. LOCKER, and G. AUBERT,(1973) Amplified rDNA expression in Drosophila melanogaster.
Genetics 74 (Suppl.) : 173

MARRAKECHI, M., (1975) Etude d'un mutant bobbed ayant une quantité normale d'ADN ribosomal.
Mol. Gen. Genetics 135 : 213

MAZABRAUD, A. (1973) Etude des ARN et de leur métabolisme dans les ovaires de Drosophila melanogaster
Thèse de Doctorat 3ème Cycle. Paris VI.

McCLINTOCK, B. (1934) The relation of a particular chromosomal element to the development of the nuclei in Zea mays.
Z. Zellforsch Mikroskop. Anat. 21 : 294

MOHAN, J. and F.M. RITOSSA, (1970) Regulation of ribosomal RNA synthesis and its bearing on the bobbed phenotype in Drosophila melanogaster,
Developmental Biology 22 : 495

MOHAN, J., (1971) Influence of the RNA content on oogenesis in the bobbed mutants of Drosophila melanogaster.
J. Embryol. Exp. Morph. 25 : 237

MORGAN, T.H., C.B. BRIDGES and A.H. STURTEVANT, (1925) The genetics of Drosophila.
S. GRAVENAGE M. NIJHOFF

MORGAN, T.H., A.H. STURTEVANT and C.B. BRIDGES, (1927) The constitution of germ material in relation to heredity.
Carnegie Inst. Washington Year book, 26 : 284

MULLER, H.J., (1935) On the incomplete dominance of the normal allelomorphs of white in Drosophila.
J. Genet. 30 : 407

NIGON, V., et J. DAILLIE, (1958) La synthèse de l'acide desoxyribonucléique au cours du développement de la drosophile.
Biochem. Biophys. Acta 29 : 246

PARDUE, M.L., S.A. GERBI, R.A. ECKHARDT and J. G. GALL, (1970) Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera.
Chromosoma 29 : 268

PEACOCK, W.J., D. BRUTLAG, E. GOLDRING, R. APPELS, V.W. HINTON and D.L. LINDSLEY, (1973) The organization of highly repeated DNA sequences in Drosophila melanogaster chromosomes.
Cold Spring Harbor of Quantitative Biology 38 : 405

PENMAN, S., (1966) RNA metabolism in the HeLa cell nucleus
J. Mol. Biol. 17 : 117

PERRY, R.P., A. HELL and M. ERRERA, (1961) The role of the nucleolus in ribonucleic acid and protein synthesis.
I. Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated HeLa cells.
Biochem. Biophys. Acta 49 : 47

PERRY, R.P., (1967) The nucleolus and the synthesis of ribosome.
Progress in nucleic acid research and molecular biology 6 : 220

PETRI, W.H., J.W. FRISTROM, D.J. STEWART and E.W. HANLY, (1971) The in vitro synthesis and characteristics of ribosomal RNA in imaginal discs of Drosophila melanogaster.
Mol. Gen. Genetics 110 : 245

PROCUNIER, J.D., and J.H. WILLIAMSON, (1974) Temperature-sensitive bobbed mutants in Drosophila melanogaster.
Developmental Biol. 39 : 198

QUAGLIAROTTI, G. and F.M. RITOSSA, (1968) On the arrangement of genes for 28S and 18S ribosomal RNA's in Drosophila melanogaster.
J. Mol.Biol. 36 : 57

RITOSSA, F.M., and S. SPIEGELMAN, (1965) Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of Drosophila melanogaster.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 53 : 737

RITOSSA, F.M., K.C. ATWOOD, D.L. LINDSLEY and S. SPIEGELMAN, (1966) On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA.
Natl Canc. Inst. monograph 23 : 449

RITOSSA, F.M., K.C. ATWOOD and S. SPIEGELMAN, (1966) A molecular explanation of bobbed mutants of Drosophila as partial deficiencies of "ribosomal" DNA.
Genetics 54 : 819

RITOSSA, F.M., (1968) Nonoperative DNA complementary to ribosomal RNA..
Proc. Natl Acad. Sci. USA 50 : 1124

RITOSSA, F.M., (1968a) Unstable redendancy of genes for ribosomal RNA.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 60 : 509

RITOSSA, F.M., C. MALVA, E. BONCINELLI, F. GRAZIANI and L. POLITO, (1971) On the first steps of rDNA magnification.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 68 : 1580

RITOSSA, F.M., (1972) A procedure for magnification of lethal deletions of genes for ribosomal RNA.
Nature (New Biology) 240 : 109

SANDLER, L. (1970) The regulation of sex chromosome heterochromatic activity by an autosomal gene in Drosophila melanogaster.
Genetics 64 : 481

SHALET, A. (1969) Exchanges at the bobbed locus of Drosophila melanogaster
Genetics 63 : 133

SCHERRER, K.J. and J.E. DARNELL, (1962) Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7 : 486

SCHMIDT, G., and S.J. THANNHAUSER, (1945) A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoprotein in animal tissues.
J. Biol. Chem. 161 : 83

SCHNEIDER, W.C., (1957) Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In : Colowick and Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. III, 680-684, Academic Press, New York

SILLEVIS SMITT, W.W., J.M. VLAK, R. SHIPHOF and Th. H. ROZIJN, (1972) Precursors of ribosomal RNA in yeast nucleus.
Explt Cell Res. 71 : 33

SINCLAIR, J. and D.D. BROWN, (1971) Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics.
Biochemistry 10 : 2761

SNYDER, L.A., and I.I. OSTER, (1964) A comparison of genetic changes induced by a monofunctional and a polyfunctional alkylating agent in Drosophila melanogaster.
Mutation Res. 1 : 437

SPEAR, B.B., and J.G. GALL, (1973) Independant control of ribosomal gene replication in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 70 : 1359

SPEAR, B.B., (1974) The genes for ribosomal RNA in diploid and polytene chromosomes of Drosophila melanogaster.
Chromosoma 48 : 159

SPENCER, W.P., and C. STERN, (1948) Experiments to test the validity of the linear R-dose/mutation frequency relation in Drosophila at low dosage.
Genetics 33 : 43

STEFFENSEN, D.M., and D.E. WIMBER, (1970) Localization of tRNA genes by "in situ" hybridization to Drosophila salivary chromosomes.
J. Cell Biol. 47 : 202a

STERN, C., (1927) Ein genetischer und Zytologisher beweis fur vererbung in Y-chromosome von Drosophila melanogaster.
Z. Ind. Abst. Vererb. 44 : 187

STERN, C., (1929) Uber die additive wirekung multipler allele.
Biol. Zbl. 49 : 261

SUEOKA, N., and T.Y. CHENG, (1962) Fractionation of nucleic acids with the methylated albumin column.
J. Mol. Biol. 4 : 161

SWIFT, H., and E. RASH, (1954) "Composition and structure of giant chromosomes" Ed. Alfert, M.
In. Int. Rev. Cytol. 3 : 131

TARTOF, K.D., and R.P. PERRY, (1970) The 5S RNA genes in Drosophila melanogaster.
J. Mol. Biol. 51 : 171

TARTOF, K.D., (1971) Increasing the multiplicity of ribosomal RNA genes in Drosophila melanogaster.
Science 171 : 294

TARTOF, K.D., (1973) Regulation of ribosomal RNA gene multiplicity in Drosophila melanogaster.
Genetics 73 : 57

TARTOF, K.D., (1973a) Unequal mitotic sister chromatid exchange and disproportionate replication as mechanisms regulating ribosomal RNA gene redundancy.
Cold Spring Harbor Symp. on Quantitative Biol. 38 : 515

TISELIUS, A., S. HJERTEN, and Ö LEVIN, (1956) Protein chromatography on calcium phosphate columns.
Arch. Biochem. Biophys. 65 : 132

WALLACE, H., and M.L. BIRNSTIEL, (1966) Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer.
Biochem. Biophys. Acta 114 : 296

WEGNEZ, M., R. MONIER, and H. DENIS, (1972) Sequence heterogeneity of 5S RNA in Xenopus laevis.
F.E.B.S. Letters 25 : 13

WEIDELI, H., (1971) RNA metabolism and protein synthesis in a cell-free system in the wild type and the letal mutant "l(3)tr" of Drosophila melanogaster.
Mol. Gen. Genetics 112 : 167

WEINMANN, R., (1972) Regulation of ribosomal RNA and 5S RNA synthesis in Drosophila melanogaster : I. Bobbed mutants.
Genetics 72 : 267

WELLAUER, P.K., and I.B. DAWID, (1974) Secondary structure maps of ribosomal RNA and DNA : I. Processing of Xenopus laevis ribosomal DNA.
J. Mol. Biol. 89 : 379

WELLAUER, P.K., R. H. REEDER, D. CARROLL, D.D. BROWN, A. DEUTCH, T. NIGASHINAKAZAWA and I.B. DAWID, (1974) Amplified ribosomal DNA from Xenopus laevis has heterogenous spacer length.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 71 : 2823

WENSINK, P.C., and D.D. BROWN, (1971) Denaturation map of the ribosomal DNA of Xenopus laevis.
J. Mol. Biol. 60 : 235

WHITEHOUSE, H.L.K., (1967) A cycloid model for the chromosome.
J. Cell. Sci. 2 : 9

WILLIAMSON, J.H., (1970) Ethyl methane sulfonate induced mutants in the Y chromosome of Drosophila melanogaster.
Mutation Res. 10 : 597

WIMBER, D.E., and D.M. STEFFENSEN, (1970) Localisation of 5S RNA genes on Drosophila chromosome by RNA hybridization.
Science 170 : 639

YANKOFSKY, S.A. and S. SPIEGELMAN, (1963) Distincts cistrons for two ribosomal RNA components.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 49 : 538